

Luz María Canet Antequera

# GENÓMICA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA ARTRITIS REUMATOIDE: A LA BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD Y DIANAS TERAPÉUTICAS



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Luz María Canet Antequera

ISBN: 978-84-9163-084-5

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44641>



***Compromiso de respeto de derechos de autor***

---

La doctoranda Luz María Canet Antequera y los directores de la tesis el Dr. D. Juan Sainz Pérez y el Dr. D. Rafael Cáliz Cáliz garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 27 de Junio de 2016

Director/es de la Tesis

Doctoranda

Fdo.: Dr. D. Juan Sainz Pérez

Fdo.: Dña. Luz M<sup>a</sup> Canet Antequera

Fdo.: Dr. D. Rafael Cáliz Cáliz



# *ABREVIATURAS*

---



- ABCB1: ATP binding cassette subfamily B member.
- ACR: The American College of Rheumatism.
- ACTH: Adrenocorticotropic hormone.
- ADAMTs: A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AICD: APP Intra Cytoplasmic Domain.
- AIMS: Arthritis impact measurements scales.
- AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.
- AKT: V-akt murine thymoma viral oncogene homolog.
- AMPc: Cyclic adenosine monophosphate.
- Anti-CCP: Anti-cyclic citrullinated peptides.
- Anti-TNF $\alpha$ : Anti-tumor necrosis factor alpha.
- AP1: Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit.
- AR: Arthritis reumatoide.
- ARA: The American Rheumatism Association.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ASPIRE: Action to Support Practices Implement Research Evidence study.
- ATG5: Autophagy related 5.
- BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2.
- BCR: B-cell receptor.
- BeST: the Behandel Strategieen study.
- BLK: BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase.
- AMPc: Adenosine monophosphate.
- CARD9: Caspase recruitment domain family member 9.
- CCL: C-C motif chemokine ligand.
- CCR: C-C motif chemokine receptor.
- CDAI: Clinical disease activity index.
- CD: Cluster of differentiation.
- COG6: Component of oligomeric golgi complex 6.
- COMT: Catechol-O-methyltransferase.
- CTLA4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4.
- CYP: Cytochrome P450; estas siglas se acompañan de un número que indica la familia, una letra que indica la subfamilia y otro número que indica el miembro, en el orden mencionado.
- CYB5A: Cytochrome b5 type A.
- CXCL: C-X-C motif chemokine ligand.
- CXCR: C-X-C motif chemokine receptor.
- DAS: Disease activity score.
- DAS28: Disease activity score 28.
- DCs: Dendritic cells.
- DC-SIGN: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin.
- DDX6: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6.
- Dectina-1: Lectina de la superfamilia del tipo C, también denominada CLEC7A (C-type lectin domain family 7 member A).
- Dectina-2: Lectina de la superfamilia del tipo C, también denominada CLEC6A (C-type lectin domain family 6 member A).

- DHODH: Dihidroorotato deshidrogenasa (quinona).
- E2: Estradiol, oestradiol o 17 $\beta$ -estradiol.
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.
- ENCODE: The encyclopedia of ADN elements.
- EOMES: Gen eomesodermin.
- EPISER: Estudio de prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española.
- eQTL: Expression quantitative trait loci.
- RE: Receptor de estrógenos.
- ERE: Elemento de respuesta a los estrógenos.
- ESPOIR: Etude et Suivi des POlyarthrites Indifférenciées Récentes.
- ESR1: Estrogen receptor 1.
- ESR2: Estrogen receptor 2.
- ETS1: ETS proto-oncogene 1.
- EULAR: The European League Against Rheumatism.
- EVA: Escala visual analógica.
- FAMES: Fármacos modificadores de la enfermedad.
- FAS: TNF-receptor superfamily 6.
- FasL: Ligando de FAS.
- Fc $\gamma$ R: Fc gamma receptor.
- FCGR2A: Fc fragment of IgG receptor IIa.
- FLI1: Proto-oncogen FLI1 o factor de transcripción ETS.
- FoxA2: Forkhead box A2.
- FoxA3: Forkhead box A3.
- FR: Factor reumatoide o reumatoideo.
- FSH: Follicle stimulating hormone.
- GATA-1: Proteína tipo 1 de unión a GATA (guanina-adenina-timina).
- GATA-2: Proteína tipo 2 de unión a GATA.
- GENEVAR: GENE Expression VARIation.
- GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
- GnRH: Gonadotropin releasing hormone.
- GSTP1: Glutatio S-transferasa PI1.
- GWAS: Genome-wide association study.
- HAQ: Health assessment questionnaire.
- HLA: Human leukocyte antigens.
- HLA-DR SE: HLA-DR shared epitope.
- HNF4 $\alpha$ : Hepatocyte nuclear factor 4-alpha isoform.
- 11 $\beta$ -HSD1: Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1.
- 11 $\beta$ -HSD2: Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2.
- IFN: Interferón.
- IFNGR2: Interferon gamma receptor 2.
- Ig: Inmunoglobulina, siglas seguidas de una letra que indica el tipo.
- IL: Interleuquina, siglas seguidas de un número que indica el tipo, una letra griega que indica el subtipo y "R" en caso de tratarse del receptor de la IL.
- IPA<sup>®</sup>: Programa Ingenuity<sup>®</sup> Pathway Analysis.
- IRAK1: Interleukin 1 receptor associated kinase 1.
- IRF: Interferon regulatory factor.
- IRM: Imagen de resonancia magnética.

- kD: Kilodaltons.
- LBH: Limb bud and heart development gene.
- LH: Luteinizing hormone.
- MAPK1: Mitogen-activated protein kinase 1.
- MCP1: C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2).
- mDCs: Myeloid dendritic cells.
- MDR: Multifactor dimensionality reduction.
- mo-DCs: Monocytes derived dendritic cells.
- MHC: Major histocompatibility complex.
- MIF: Macrophage migration inhibitory factor.
- MISS: Membrane initiated steroid signaling.
- MMP: Matrixmetaloproteínasas.
- NFkB: Nuclear Factor-kappa B.
- NK: Natural killers.
- NR112: Pregnane X o PXR gene.
- NRAMP1: Natural resistance associated macrophage protein 1.
- OB: Osteoblasto.
- OC: Osteoclasto.
- OMERACT: Outcome measures in rheumatoid arthritis clinical trials.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- OPG: Osteoprotegerin.
- OR: Odds ratio.
- P450ssc: Enzima desmolasa o CYP11A1.
- PADI4: Peptidyl arginine deiminase 4.
- PBMCs: Peripheral blood mononuclear cell.
- PCR: Proteína C-reactiva.
- pDCs: Plasmacytoid dendritic cell.
- PGR: Progesterone receptor.
- PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha.
- PICS: Probabilistic identification of causal SNPs.
- PKA: Protein kinase A.
- PRDM1: Progesterone receptor domain 1.
- PRL: Prolactina.
- PTPN1: Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1.
- PTPN22: Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22.
- RAD51B: RADiation sensitive 51 paralog B.
- RANK: Receptor activator of NFkB.
- RANKL: RANK ligand.
- REL: Reticuloendoteliosis oncogene.
- RelB: Receptor de REL.
- RFC1: Replication factor C subunit 1.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SDAI: Simplified disease activity index.
- SHBG: Sex hormone binding globulin.
- SNP: Single nucleotide polymorphism.
- SP1: Specificity protein 1.

- STAT4: Signal transducer and activator of transcription 4.
- SULT1A1: Sulfotransferasa 1A-dehidroepiandrosterona tipo 1.
- SULT2A1: Sulfotransferasa 2A-dehidroepiandrosterona tipo 1.
- SWEFOT: Analysis of the swedish farmacootherapy study.
- SYNGR1: Sinaptogirina 1.
- SyK: Spleen tyrosine kinase.
- TCR: T cell receptor.
- Th: T cell helper.
- TIM-3: T cell immunoglobulin and mucin domaincontaining protein 3.
- TLR: Toll like receptor.
- TRAF1/C5: TNF receptor associated factor 1/complement component 5.
- Treg: T cell regulatory.
- TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ .
- TNF $\alpha$ IP3: TNF $\alpha$  induced protein 3.
- TNFRSF: TNF $\alpha$  receptor superfamily.
- TYK2: Tyrosine kinase 2.
- UBASH3A: Ubiquitin associated and SH3 domain containing A.
- UBE2L3: Ubiquitin conjugating enzyme E2 L3.
- UTR: Untranslated región.
- VDR: Vitamin D receptor.
- VEGF: Vascular endothelial growth factor.
- VGP: Valoración global del paciente.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VSG: Erythrocyte sedimentation rate.
- Wnt: Wingless e Int.





## **Resumen**

---

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad común y compleja que se caracteriza por un proceso inflamatorio sistémico y crónico que afecta principalmente a las articulaciones y que suele ocasionar la destrucción del cartílago y del hueso, originando grave discapacidad y mortalidad prematura en el paciente. Su incidencia es mayor en mujeres que en hombres y suelen ser ellas las que presentan un peor pronóstico y una menor respuesta terapéutica.

Aunque aún se desconocen en gran medida los mecanismos etiopatogénicos que originan la enfermedad, hoy sabemos que se desarrolla posiblemente como consecuencia de la interacción entre factores ambientales, hormonales y genéticos. Entre ellos el componente genético parece jugar un papel bastante relevante. En las últimas décadas, múltiples estudios de genes candidato y de asociación del genoma completo (GWAS, *genome wide association study*) han demostrado que la presencia de ciertos polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) puede influir no sólo en el desarrollo de la enfermedad si no además determinar la respuesta a los diferentes tratamientos e incluso la aparición de ciertas complicaciones clínicas afectando así la evolución del paciente. Sin embargo, a pesar de estas evidencias y de los recientes avances en el área de la genética, todavía es escasa la utilización de marcadores genéticos en la práctica clínica.

De acuerdo a estas premisas y asumiendo el papel de la genética en la AR, el objetivo de la presente tesis doctoral ha consistido en analizar si la presencia de polimorfismos en genes relacionados con el sistema inmune y con la síntesis, el metabolismo, el transporte y la señalización de las hormonas esteroideas influye sobre el riesgo a desarrollar AR y sobre la respuesta al tratamiento con fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$  (anticuerpos monoclonales contra el factor de necrosis tumoral alpha). Por otra parte, dadas las diferencias existentes tanto en la incidencia como en la evolución de la enfermedad entre hombres y mujeres y considerando además la posible heterogeneidad genética entre pacientes con FR positivo y negativo, nos planteamos además evaluar el efecto modificador de género y el factor reumatoide (FR) en relación a la asociación de los polimorfismos con la susceptibilidad a desarrollar AR y la respuesta terapéutica. Finalmente, debido a las enormes diferencias en la respuesta terapéutica observada en nuestros pacientes, nos propusimos investigar mediante la construcción de modelos predictivos si las variantes genéticas analizadas nos permitían predecir con certeza la respuesta de los pacientes a los tratamientos con fármacos anti-TNF $\alpha$ .

Los resultados obtenidos que detallamos a lo largo de esta tesis muestran el potencial y la utilidad que el análisis genético puede ofrecer para la mejora en el manejo clínico de los pacientes con AR.



# *ÍNDICE*

---

INTRODUCCIÓN.....	16
1.Artritis reumatoide: definición .....	18
2.Epidemiología de la AR .....	18
2.1.Impacto de la AR.....	18
2.2.Factores de riesgo para el desarrollo de AR .....	19
2.2.1.Factores de riesgo demográficos .....	19
2.2.2.Factores de riesgo ambientales .....	20
2.2.3.Factores de riesgo hormonales .....	21
2.2.4.Factores de riesgo genéticos.....	21
2.2.5.Factores de riesgo para que una enfermedad articular derive en AR.....	22
3.Clínica de la AR.....	23
4.Diagnóstico clínico de la AR .....	23
4.1.Clasificación: criterios ACR/EULAR 2010 .....	26
4.2.Pruebas de diagnóstico de la AR .....	27
4.2.1.Historia clínica .....	27
4.2.2.Pruebas biológicas.....	28
4.2.3.Exploración física.....	29
4.2.4.Pruebas radiológicas y de imagen.....	31
5.Tratamiento de la AR .....	32
5.1.Tipos de Tratamientos: Biológicos y No Biológicos .....	32
5.1.1.Tratamiento de primera elección.....	32
5.1.2.Fármacos biológicos .....	33
5.2.Evaluación de la respuesta terapéutica.....	34
5.3.Diagnóstico de remisión de la AR .....	34
6.Patogénesis de la AR .....	35
6.1.Daño Tisular .....	35
6.1.1.Macrófagos .....	37
6.1.2.Células dendríticas .....	38
6.1.3.Fibroblastos.....	39
6.1.4.Células T .....	39
Linfocitos T cooperadores o células T helper.....	40
Linfocitos T citotóxicos.....	40
Células T Reguladoras .....	40
Células T Natural Killer (NK).....	41
6.1.5.Células B .....	41
6.1.6.Neutrófilos .....	42
6.1.7.Basófilos .....	42
6.1.8.Monocitos .....	42
6.1.9.Osteoblastos y osteoclastos.....	43
6.1.10.Mastocitos.....	43
6.1.11.Condrocitos .....	43
6.2.Citoquinas Relevantes en la Patogénesis de la AR .....	45
6.2.1.TNF $\alpha$ .....	45
6.2.2.IL17 .....	45
6.2.3.IL1 .....	46
6.2.4.IL4.....	46
6.2.5.IL6.....	46
6.2.6.IL12.....	46
6.2.7.IFN .....	46
6.2.8.GM-CSF.....	46
6.3.El papel de las hormonas esteroideas en la respuesta inmune inflamatoria.....	47
6.3.1.Las hormonas esteroideas .....	47
6.3.2.Biosíntesis de las hormonas esteroideas .....	48

Síntesis de las hormonas esteroideas en la corteza adrenal.....	48
Síntesis de las hormonas esteroideas en las gónadas.....	50
6.3.3.Receptores de las hormonas esteroideas .....	51
6.3.4.El papel de las hormonas esteroideas en la AR.....	52
Las hormonas esteroideas sexuales en la AR.....	52
Receptores y vías de acción de los estrógenos.....	53
Condicionantes de los efectos de los estrógenos.....	54
Efectos de los estrógenos en los distintos tipos celulares.....	55
Receptores de la progesterona.....	58
Efectos de la progesterona sobre los componentes celulares del sistema inmune .....	58
7.Genética de la AR .....	60
7.1.Evolución de la genética de la AR .....	60
7.2.Hallazgos genéticos en regiones inmunomoduladoras .....	63
7.2.1.Región HLA .....	63
7.2.2.Regiones distintas al HLA (no-HLA) .....	63
7.2.3.Regiones relacionadas con las hormonas esteroideas.....	64
8.Modelos predictivos de susceptibilidad a AR y respuesta terapéutica .....	65
JUSTIFICACIÓN .....	68
OBJETIVOS.....	72
ANEXO PUBLICACIONES .....	76
Artículo primero.....	78
Artículo segundo.....	100
Artículo tercero.....	130
Artículo cuarto .....	148
RESULTADOS DE LOS ARTÍCULOS.....	194
1.Artículo Primero .....	196
1.1.Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:.....	196
1.1.1.Población de estudio. ....	196
1.1.2.Metodología empleada: .....	196
Selección de las variantes genéticas. ....	196
Genotipado. ....	196
Análisis de asociación a AR.....	196
Predicción in silico de la funcionalidad de los SNPs de interés. ....	197
1.2.Resultados .....	197
2.Artículo segundo .....	198
2.1.Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:.....	198
2.1.1Población de estudio. ....	198
2.1.2.Metodología empleada: .....	199
Selección de las variantes genéticas. ....	199
Genotipado .....	199
Análisis de asociación a AR.....	199
Análisis de haplotipos .....	199
Análisis de interacción SNP-SNP .....	199
Análisis de correlación genotipo-fenotipo: expresión génica .....	200
Meta-análisis.....	200
Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$ .....	200
2.2.Resultados .....	200
3.Artículo tercero .....	202
3.1.Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:.....	202
3.1.1.Población de estudio. ....	202
3.1.2.Metodología empleada: .....	203
Selección de las variantes genéticas .....	203
Genotipado .....	203

Análisis de asociación a AR .....	203
Análisis de haplotipos .....	203
Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$ .....	203
Meta-análisis.....	203
3.2.Resultados .....	204
4.Artículo cuarto .....	205
4.1.Justificación del diseño y breve descripción de los resultados: .....	205
4.1.1.Población de estudio.....	205
4.1.2.Población de replicación .....	206
4.1.3.Metodología empleada:.....	206
Selección de las variantes genéticas.....	206
Genotipado .....	206
Análisis de asociación a AR .....	206
Análisis de haplotipos .....	206
Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$ .....	206
Meta-análisis con datos de GWAS previos .....	207
Test de heterogeneidad de la población .....	207
Predicción in silico de la funcionalidad de los SNPs de interés.....	207
Análisis eQTL: expresión génica.....	207
Modelo predictivo y capacidad de discriminación .....	207
4.2.Resultados: .....	208
DISCUSIÓN .....	210
1.Impacto de los marcadores genéticos relacionados con la vía Th17 en la predisposición a la AR .....	213
2.Polimorfismos relacionados con la respuesta Th1 y Th2 durante el desencadenamiento de la AR.....	215
3.Implicación de los SNPs en genes relacionados con las hormonas esteroideas en el riesgo a desarrollar AR .....	219
4.Capacidad predictiva de las variantes genéticas en el fracaso terapéutico de la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ .....	220
5.Aportación de los modelos predictivos a la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ .....	225
CONCLUSIONES .....	230
BIBLIOGRAFÍA.....	234

# *INTRODUCCIÓN*

---





## 1. *Artritis reumatoide: definición*

La artritis reumatoide (AR) es una grave enfermedad de carácter autoinmune caracterizada por una inflamación crónica y simétrica de las articulaciones, dolor articular y destrucción del tejido sinovial adyacente, pudiendo afectar también a otros tejidos u órganos extra-articulares. La AR da lugar a un daño articular progresivo y en sus fases más severas implica la aparición de erosiones, pérdida de la funcionalidad, invalidez y aumento de la mortalidad. Esta enfermedad tiene una alta prevalencia a nivel mundial y genera un impacto socioeconómico elevado.

## 2. *Epidemiología de la AR*

### 2.1. Impacto de la AR

La AR resulta ser la enfermedad reumática más común con más de 21 millones de personas que padecen esta enfermedad en el mundo. Posee una prevalencia que varía entre el 0,5% y 1% a nivel mundial, y en nuestro país afecta a más de 200.000 personas [1]. Según el estudio EPISER (Estudio de Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española) [2], en España la AR tiene una prevalencia de 0,5% [0,3-0,9] y cada año se diagnostican 20.000 casos nuevos [3].

La prevalencia de la AR varía ampliamente según la zona geográfica. En el norte de Europa y en Estados Unidos se estima que la AR tiene una prevalencia del 1%, mientras que en Asia y en el sur de Europa dicha prevalencia se sitúa en torno al 0,5% [4]. Los indios americanos originarios de Norte América [5] y los esquimales nativos de Alaska presentan la mayor prevalencia de esta enfermedad, en torno al 7% [6] mientras que las tasas más bajas se han observado en individuos afroamericanos y africanos (0 a 0,42%) (Tablas 1 y 2) [7-9].

**Tabla 1.** Valores de incidencia y prevalencia de AR en Europa y Norteamérica.

Poblaciones Mundiales	Incidencia (casos/100000 habitantes)	Prevalencia (casos/100 habitantes)
Norte de Europa	29 (24-36)	0,5 (0,44-0,8)
Sur de Europa	16,5 (9-24)	0,33 (0,31-0,5)
Norteamérica	38 (31-45)	0,5

Incidencia y prevalencia con el intervalo de confianza entre paréntesis.

**Tabla 2.** Ejemplos de valores de prevalencia de AR en diferentes regiones a nivel mundial.

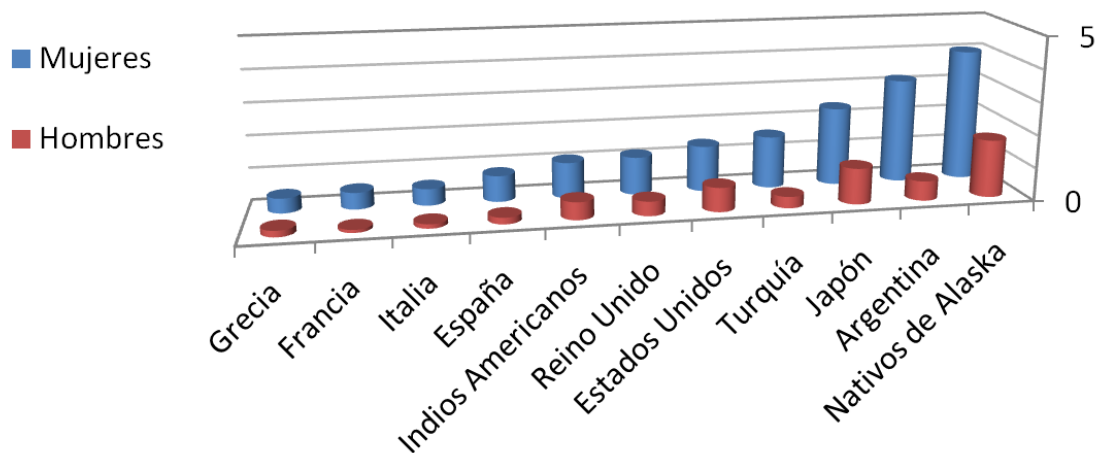
Población	Prevalencia	Población	Prevalencia
China y Japón	0,2-0,37	Ciudad del Cabo	0,1
España	0,3-0,9	Indios Chippewa	6,8
Taiwán	0,9	Esquimales	7,1

Valores de prevalencia de AR expresados en tanto por ciento.

Es importante destacar que, además de las diferencias de prevalencia de AR por región geográfica o raza, también se observan diferencias de acuerdo al género del paciente, que suelen afectar a la progresión y severidad con la que la enfermedad se manifiesta. Las mujeres no sólo presentan una mayor incidencia de AR sino que además suelen presentar síntomas más severos y,

generalmente, peor pronóstico que los hombres. Estas diferencias de género son consistentes en cualquier región del mundo y la ratio hombres:mujeres es de 1:3 o incluso 1:4 (Figura 1) [10, 11].

**Figura 1.** Diferente prevalencia de AR en mujeres y hombres en ejemplos de distintas poblaciones del mundo.



Representación de las diferencias de los valores de prevalencia entre sexos en la población de distintas regiones a nivel mundial. La escala de valores de prevalencia (0-5) está expresada en tantos por cien. El color azul representa a las mujeres y el rojo a los hombres.

## 2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de AR

A pesar de la falta de conocimiento sobre la etiopatogenia de esta enfermedad autoinmune, hoy conocemos que la AR se produce como consecuencia de la interacción de factores hormonales, ambientales y genéticos. Aunque el estilo de vida del paciente y factores como la exposición a ciertos componentes químicos o el desarrollo de infecciones han sido históricamente considerados como factores de riesgo de gran importancia que han dado lugar al desarrollo de modelos predictivos [12], la AR es una enfermedad multifactorial en la cual los factores genéticos parecen jugar además un papel muy relevante [13, 14]. De manera resumida, los principales factores de riesgo reconocidos para la AR son: la edad, el sexo, el tabaquismo, las infecciones previas y la predisposición genética [15].

### 2.2.1. Factores de riesgo demográficos

- **Edad.** Aunque la AR puede surgir a cualquier edad, su aparición es más frecuente en adultos mayores de 45 años. Existe una relación entre el avance de la edad y la disminución de la efectividad del sistema inmune, hecho que viene a correlacionar la edad avanzada con la aparición de esta enfermedad autoinmune [16]. De hecho, algunos estudios muestran diferencias en cuanto a los pacientes que desarrollan la enfermedad antes de los 60 años (mejor pronóstico) y después (mayor severidad) [17].
- **Etnia.** El riesgo de AR varía con el origen étnico; pues se ha visto que los indios nativos norteamericanos y las tribus esquimales tienen un riesgo de cuatro a seis veces superior a los caucásicos europeos o americanos, mientras que las razas asiática y africana son las que menor prevalencia de AR presentan. La etnia como factor de riesgo de la AR va ligada a la predisposición genética del individuo. De hecho, estudios poblacionales sobre la

emigración/inmigración y posteriores generaciones [18], así como los novedosos estudios genéticos en extensas regiones del genoma demuestran el peso de la etnia como factor de riesgo para la AR.

### 2.2.2. *Factores de riesgo ambientales*

- **Estatus socioeconómico.** Existen evidencias de que los factores socio-económicos, como pueden ser el nivel de educación o el lugar de residencia, pueden influir en la severidad, morbilidad y mortalidad de la enfermedad [17, 19-21]. La explicación más plausible es la falta de conocimiento del paciente sobre su enfermedad y sus necesidades ante la misma, así como la inaccesibilidad a la atención médica o al tratamiento. En línea con esta hipótesis se ha descrito que la educación dirigida al paciente mejora el pronóstico [22] pero además que el factor socioeconómico viene ligado al tipo de trabajo que puede desempeñar el paciente y, por tanto, a las sustancias a las que éste se expone, determinando así el riesgo a desarrollar la enfermedad. Un ejemplo lo constituyen los mineros que se ha comprobado que son más susceptibles a desarrollar AR debido a su exposición continuada al polvo de sílice [23-26].
- **Tabaquismo.** Desde la década de los años 80, se conoce que fumar es un importante factor de riesgo para el desarrollo de AR [27]. Un amplio número de estudios de casos-controles e investigaciones prospectivas han demostrado que el tabaquismo podría explicar hasta el 25% de los casos [28-31] y que su efecto es dependiente de la dosis [32]. Fumar puede provocar cambios epigenéticos al interactuar con los genes del epítipo compartido (*HLA-DR SE*), y también puede potenciar la respuesta específica del sistema inmune frente a las proteínas citrulinadas [33, 34]. Además, se ha demostrado que fumar incrementa la producción del factor reumatoide (FR) y de anticuerpos anti-peptídicos cíclicos citrulinados (anti-CCP), pudiendo explicar la seropositividad en aproximadamente el 30% de los pacientes [30, 33, 35]. Por último, algunos estudios han sugerido que este hábito además potencia la aparición de afectaciones extraarticulares e incrementa el riesgo de sufrir pulmón reumatoideo y vasculitis.
- **Dieta.** Aunque los resultados de la mayoría de estos estudios no son concluyentes y parecen ser poco reproducibles [36, 37], estudios recientes sugieren que el consumo de vitamina D, antioxidantes, pescado e hierro puede tener un efecto protector frente a la AR [38-40]. Además, estudios en modelos animales de AR sugieren un efecto protector para el consumo de aceite de oliva virgen [41-43]. Por otra parte, existe además controversia en cuanto al efecto del alcohol sobre el riesgo a desarrollar AR. Aunque algunas investigaciones han descartado su implicación en AR [44], otras han asociado su consumo a un efecto protector [38, 45] que, según se ha propuesto, puede ser dosis-dependiente [46-48].
- **Obesidad.** Es ampliamente conocido que el tejido adiposo, especialmente la masa grasa visceral, secreta citoquinas proinflamatorias derivadas de los adipocitos (adipoquinas) que promueven la inflamación sistémica. Así pues, los individuos obesos suelen presentar niveles más elevados de proteína C-reactiva (PCR), TNF $\alpha$ , glóbulos blancos (WBC, *white blood cells*) e IL6 que los podría hacer más susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes. A este respecto, los estudios de casos y controles han demostrado una correlación positiva entre la obesidad y el desarrollo de AR, especialmente en aquellos pacientes que no presentan anticuerpos anti-CCP [49-52].
- **Estrés.** El estrés favorece la aparición y la severidad de las enfermedades autoinmunes inflamatorias. El estrés psicológico puede estar causado por el estilo de vida o por la propia

enfermedad y su tratamiento [53, 54]. En la AR el estrés del paciente puede promover el agravamiento de la enfermedad y la aparición de afectaciones extra-articulares, en especial las relacionadas con el sistema cardiovascular [55].

- **Infecciones Previas.** La asociación entre las infecciones y las enfermedades reumáticas se ha propuesto de forma controvertida en las últimas décadas pero sigue siendo hoy una incognita [56-58]. En 1974 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el ACR establecieron cuatro grupos para clasificar la aparición conjunta de infecciones y distintos tipos de artritis [59]. Las infecciones agudas en artritis suelen venir provocadas por virus y bacterias piógenas (*Porphyromonas gingivalis*), mientras que la artritis crónica se asocia a infecciones con micobacterias y hongos. Los microorganismos provocar daño articular mediante una colonización directa que activa una respuesta inmune inflamatoria (*Neisseria gonorrhoea*, *Borrelia burgdorferi*, *Dracunculus medinensis*), o a través de la promoción de la autoinmunidad en el paciente (bacterias gram negativas entéricas, virus *Epstein-Barr* o Citomegalovirus) [60].

### 2.2.3. Factores de riesgo hormonales

- **Género.** La diferencia de género en la incidencia de la AR ha sido ampliamente estudiada. Ser mujer es un claro factor de riesgo para desarrollar AR y la ratio de prevalencia es del orden de 3 a 1 frente a los hombres. Además, las mujeres suelen presentar unos síntomas más severos y una progresión más rápida de la enfermedad que los hombres además de una peor tasa de respuesta al tratamiento lo que, a menudo, resulta en un peor pronóstico [11]. Los estudios observacionales durante las diferentes etapas fisiológicas de la mujer, como son el embarazo, la edad fértil y la menopausia, demuestran que los cambios en la severidad y la progresión de la AR podrían tener una explicación hormonal [61-64].
- **Factores Hormonales.** Las hormonas esteroideas pueden influir en la respuesta inmune y afectar al desencadenamiento, la evolución y la remisión de la enfermedad. Es, por tanto, plausible sugerir que además puedan explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en la prevalencia y evolución de la enfermedad entre hombres y mujeres [64-67]. Estudios observacionales han demostrado que el incremento de los niveles de estrógenos que tiene lugar durante el embarazo protege a la mujer de la AR, mientras que, por contrario, la llegada de la menopausia y la retirada de los estrógenos se traduce en un incremento del riesgo a desarrollar la enfermedad [15, 38]. En línea con estos resultados, recientes estudios epidemiológicos han demostrado además que el uso de anticonceptivos hormonales o el tratamiento hormonal sustitutivo reduce el riesgo a desarrollar AR [44].

### 2.2.4. Factores de riesgo genéticos

Los factores genéticos pueden afectar tanto al desarrollo y progresión de la enfermedad como a la respuesta terapéutica. Aunque hasta la fecha no se ha descrito ningún marcador genético como causa necesaria para el desencadenamiento de la AR, los factores genéticos implicados en el desarrollo de la enfermedad son numerosos y varían sustancialmente entre pacientes. Entre esos factores los más estudiados han sido los polimorfismos de un único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) que, aunque tienen baja penetrancia pueden tener un impacto moderado sobre la enfermedad. En el contexto de la AR, estos factores genéticos se pueden clasificar de acuerdo a su ubicación en:

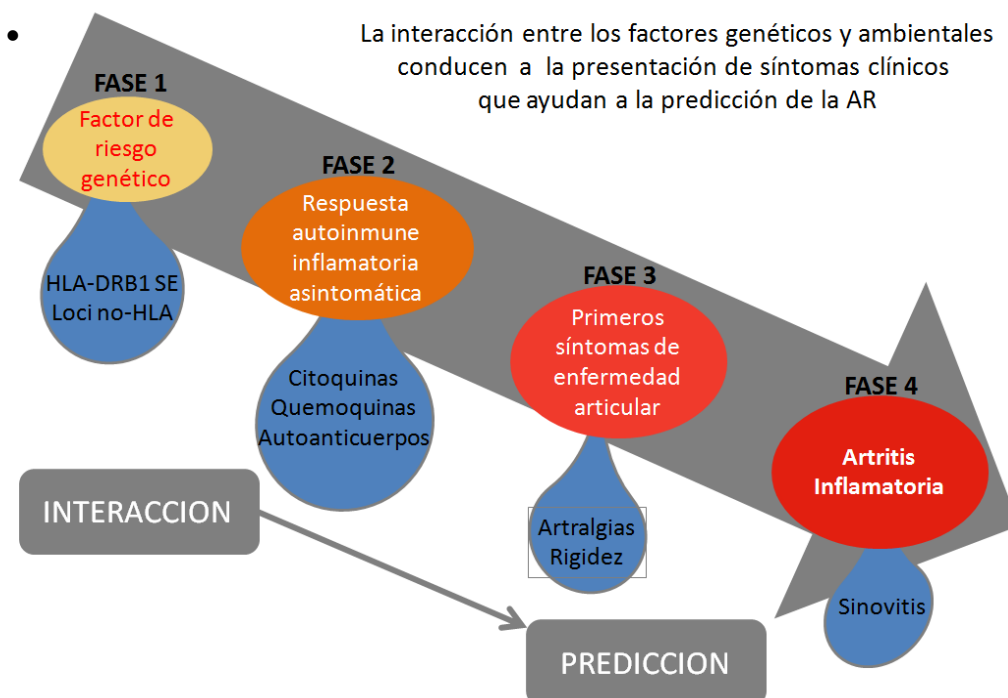
- **Variaciones genéticas en genes HLA (*human leukocyte antigens*).** El HLA es la región genética más estudiada en el ámbito de la autoinmunidad y contiene la mayor parte de las variantes genéticas que influyen en la susceptibilidad a desarrollar AR. En particular, se ha encontrado que una secuencia de aminoácidos en la tercera región hipervariable de las cadenas beta HLA-DR (también llamada epítipo compartido) está fuertemente asociada al desarrollo de AR y que su efecto se potencia en presencia de ciertos factores ambientales [34].
- **Variaciones genéticas en genes no-HLA.** En los últimos años el avance en las investigaciones genéticas en AR ha permitido describir nuevos marcadores de riesgo para esta enfermedad localizados a lo largo de todo el genoma humano [68] que están incluso siendo utilizados para la creación de modelos que permitan predecir tanto el riesgo a desarrollar la enfermedad como su progresión y la respuesta a ciertos tratamientos [14, 69].

### 2.2.5. Factores de riesgo para que una enfermedad articular derive en AR

Cuando un paciente sufre una enfermedad reumática o articular existen una serie de factores de riesgo que favorecen que dicha enfermedad culmine en una AR. Se ha demostrado que los factores de riesgo ambientales, hormonales y genéticos interaccionan entre sí pero además con ciertos síntomas clínicos para favorecer la aparición de la enfermedad [15]. La *European League Against Rheumatism* (EULAR) ha detallado recientemente cuales son los principales factores de riesgo a tener en cuenta para que un paciente reumático padezca AR y, por tanto, insta al reumatólogo a realizar un seguimiento del paciente en base a dichos factores [70]:

- Factores genéticos y medioambientales [10, 71-73].
- Presencia de FR y anticuerpos anti-CCP [15].
- Síntomas de inflamación articular sin evidencias clínicas de sinovitis [74, 75].
- Sinovitis sin evidencia clínica de AR [75-77].
- Síntomas clínicos similares a la AR, pero no suficientes para poder confirmar el diagnóstico de la enfermedad [78].

Figura 2. Representación de las fases previas al diagnóstico de AR en un paciente reumático.



### **3. Clínica de la AR**

---

La AR es una de las enfermedades reumáticas más incapacitantes. Según el estudio EPISER desarrollado en nuestro país, esta dolencia es una de las enfermedades que más se asocian a una limitación física y, por tanto, a una peor calidad de vida. Esta enfermedad autoinmune reduce entre 5 y 10 años la esperanza de vida de los pacientes y más de la mitad de ellos desarrollan una discapacidad grave durante los 10 años primeros años tras su diagnóstico. Este estudio muestra que el 84.6% de los pacientes con AR no pueden realizar tareas cotidianas de manera normal (tareas del hogar, caminar, abrir recipientes, coger peso, elevar o bajar algo,...) y la mitad de los pacientes necesitan ayuda para afrontar su día a día (55,7%) [79]. Los pacientes además ven deteriorada notablemente su calidad y esperanza de vida debido a que sufren numerosas inflamaciones articulares, dolor y pérdida de movilidad [80, 81].

Los síntomas de la enfermedad se deben a una inflamación crónica y generalmente simétrica que afecta sobre todo a las articulaciones y a sus tejidos adyacentes. Dicha inflamación conduce a la destrucción progresiva del cartílago y del tejido óseo (artritis erosiva) y produce una disminución de la funcionalidad del miembro afectado con la aparición del característico dolor sintomático. Además de estos síntomas clásicos, durante el transcurso de la enfermedad pueden surgir afectaciones extra-articulares que incrementan la severidad de la enfermedad. La más frecuente son los nódulos reumatoides que están constituidos por bultos bajo la piel de tejido inflamatorio y cicatricial, presentes en uno de cada 4 pacientes y asociados al factor reumatoide positivo. Otras complicaciones extra-articulares más raras y presentes en fases severas de la enfermedad son el pulmón reumatoideo, la arterioesclerosis, lesiones de la columna, vasculitis reumatoidea (que puede afectar a un amplio rango de tejidos como la piel, los nervios, el corazón y el cerebro), pericarditis, miocarditis o incluso insuficiencia cardíaca congestiva. Aunque las afectaciones principales de esta enfermedad se centran en las articulaciones, no hay que restarle importancia a las implicaciones extra-articulares, puesto que a menudo son la causa de la mortalidad prematura de los pacientes. Por ejemplo, las ratios de morbilidad y mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares se incrementan en un 50% en los pacientes de AR en comparación con la población general, lo que ha hecho que esta enfermedad autoinmune se considere como un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de enfermedades [82, 83].

### **4. Diagnóstico clínico de la AR**

---

Aunque el diagnóstico temprano de la AR resulta esencial para controlar el proceso inflamatorio y reducir el daño estructural [84], en la práctica clínica resulta difícil realizar el diagnóstico en los primeros estadios de la enfermedad, ya que la cronicidad de la inflamación y la destrucción articular, características clínicas que definen la AR, necesitan tiempo para manifestarse. En las fases iniciales de la enfermedad suele existir una inflamación subclínica o poco sintomática que sólo puede detectarse mediante técnicas de alta sensibilidad (Ecografía Power Doppler, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y ELISA para detección de anticuerpos) [85] que, por el momento, no han sido implementadas como procedimientos estándares para el diagnóstico de la AR.

A lo largo de las últimas décadas se han establecido diferentes criterios para el diagnóstico de la AR. El primer intento destacable lo realizaron Pinnals y colaboradores en 1981 y establecieron que el paciente debe de cumplir al menos cinco de los siguientes criterios durante un período igual o mayor a dos meses consecutivos: rigidez articular matutina durante al menos 15 minutos, fatiga,

dolor articular, sensibilidad articular, inflamación articular y aumento del rango de sedimentación de los eritrocitos [86]. En 1987, *The American Rheumatism Association* (ARA) estableció unos criterios de clasificación aún vigentes que no sólo consideraban signos y síntomas clínicos sino que además incluían pruebas biológicas y de imagen. Dichos criterios resultaron ser mucho más eficaces para diferenciar la AR de otras enfermedades reumáticas [87] y se presentaron tanto en forma de algoritmo (muy empleado en estudios epidemiológicos y de investigación) como en formato de lista.

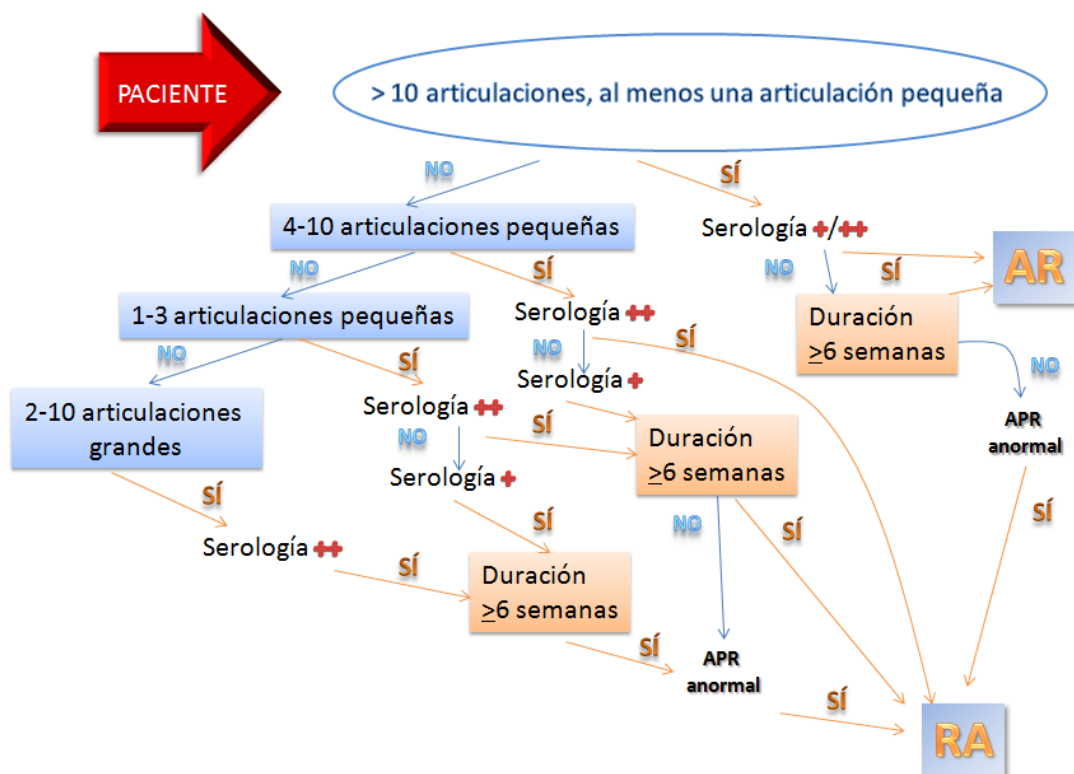
Los criterios en formato de lista son:

- Rigidez articular matutina durante al menos una hora.
- Artritis de 3 ó más grupos articulares simultáneamente. Inflamación del tejido blando; las articulaciones de los 14 grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos o metatarsfalángicas.
- Artritis en manos. Al menos una de las articulaciones inflamada: metacarpiana, metacarpofalángica o interfalángica.
- Artritis simétrica. Afectación simultánea de articulaciones en ambos lados del cuerpo.
- Presencia de nódulos reumatoides. Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxta-articulares.
- FR positivo en suero. Valores elevados de FR determinados con cualquier método que de resultados positivos en menos del 5% de las muestras control.
- Daño radiológico. Erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en articulaciones afectadas.

A pesar del importante avance que ha supuesto el establecimiento de estos criterios en el manejo del paciente con AR, estos criterios han demostrado tener poca utilidad en AR temprana con una sensibilidad de menos del 50% en pacientes con menos de 3 meses de evolución y con escasa capacidad para predecir la aparición de sinovitis persistente o la necesidad de FAMES durante el primer año de enfermedad [88, 89]. Recientemente, la EULAR y el ACR han elaborado conjuntamente unos criterios de clasificación de la AR en 2010 que tienen menos limitaciones para detectar la enfermedad en una fase más temprana [90, 91]. Según la EULAR, los criterios ACR/EULAR 2010 son los que deben emplearse para el diseño de estudios epidemiológicos de la enfermedad y el desarrollo de ensayos clínicos. En la actualidad, los reumatólogos también usan estos criterios para el diagnóstico clínico de la enfermedad y para clasificar a los pacientes que presentan una AR precoz. Estos criterios evalúan el riesgo de un individuo a padecer AR en función de variables clínicas y de laboratorio, así como de su importancia relativa pues la EULAR ha establecido un orden de criterio de valoración de cada parámetro clínico (Figura 3).

Los criterios de 2010 siguen sin poder diagnosticar o clasificar el 100% de los casos de AR y, por tanto, necesitan ser revisados. Un estudio realizado en Estados Unidos y publicado en 2014, puso de manifiesto la eficacia parcial de estos criterios [92]. En dicha investigación un grupo de expertos reumatólogos realizó una revisión independiente del diagnóstico de AR de 128 pacientes siguiendo los diferentes criterios establecidos hasta la fecha para el diagnóstico de la enfermedad. Como resultado del estudio el 77% de los pacientes cumplían los criterios de 1987 y un 63% satisfacían los criterios del ACR/EULAR 2010; sin embargo, los grupos de individuos diagnosticados bajo los diferentes criterios no coincidían. Como conclusión de esta investigación se sugiere que una combinación de ambos criterios podría mejorar el diagnóstico de AR [92]. En la tabla 3 se pueden observar los valores de sensibilidad y eficacia obtenidos en el mencionado estudio para cada uno de los criterios empleados.

**Figura 3.** Criterios del ACR/EULAR 2010 para la evaluación del riesgo de padecer AR.



Esquema de los criterios del ACR/EULAR 2010 para el correcto diagnóstico de la AR en un paciente. Uno o dos positivos en la serología se refiere al RF y al anti-CCP. Abreviaturas: APR, *acute phase response*, se refiere a valores anormales de niveles de PCR o velocidad de sedimentación globular (VSG).

Además, Radner y colaboradores hicieron una revisión sistemática de la literatura y analizaron la eficacia de los criterios ACR/EULAR 2010 para el diagnóstico y clasificación de esta enfermedad. Los autores de este trabajo observaron que los criterios empleados en la actualidad tienen una alta sensibilidad para el diagnóstico de AR (82%) pero muestran tener una baja especificidad (61%) que se traduce en un alto porcentaje de pacientes sin un diagnóstico claro y temprano de AR [93]. Entre 1 y 2 de cada 5 pacientes eran erróneamente diagnosticados con AR lo que sugería que estos criterios todavía deben ser ampliamente testados.

**Tabla 3.** Concordancia entre la evaluación de los pacientes reumáticos realizada por diferentes expertos y siguiendo los distintos criterios existentes para el diagnóstico de la AR.

	Criterios ACR 1987	Criterios ACR/EULAR 2010	Cumple criterios 2010 ó 1987	Cumple ambos criterios
Sensibilidad	0.93	0.79	0.99	0.72
Especificidad	0.77	0.87	0.67	0.97
Valor predictivo positivo	0.93	0.95	0.91	0.99
Valor predictivo negativo	0.77	0.55	0.95	0.52

Valores expresados según el coeficiente kappa, donde k=1 sería la máxima concordancia y k=0 correspondería al azar. Datos obtenidos de la investigación realizada por el Dr. Kasturi [92].



Hoy en día existen grandes avances en las técnicas clínicas para detectar y visualizar los daños tisulares provocados por la enfermedad. Las últimas investigaciones realizadas sobre los criterios diagnósticos sugieren incorporar técnicas nuevas que evalúen el daño radiológico para mejorar el diagnóstico clínico. Por ejemplo, Burgers y colaboradores publicaron un estudio con 1502 pacientes de AR, de los cuales 550 pacientes cumplían los criterios de 1987, 788 pacientes cumplían los criterios ACR/EULAR 2010 y 489 cumplían ambos criterios. Observaron que incluir el daño radiológico como criterio para el diagnóstico de AR resultaba crítico ya que los pacientes clasificados bajos los criterios de ACR/EULAR 2010 presentaban menor daño radiológico y tendían a tener mayores porcentajes de remisión tras la administración de FAMES que aquellos diagnosticados de acuerdo a los criterios de 1987 [94]. En línea con estos datos, estudios posteriores han coincidido en la importancia de incluir el daño radiológico en los criterios de diagnóstico de AR [95, 96]. Finalmente, Rezaei et al. (2014) han sugerido que, ante un diagnóstico dudoso, sería importante incorporar a la rutina clínica técnicas de ultrasonidos que facilitarían la determinación del daño articular y/o fórmulas de probabilidad (como el teorema de Bayer) que incrementan la eficacia del diagnóstico clínico de la AR [96].

#### 4.1. Clasificación: criterios ACR/EULAR 2010

Los criterios ACR/EULAR 2010 son unos criterios establecidos para mejorar la clasificación de los pacientes con AR y así poder seleccionar el tratamiento más adecuado en cada caso. Es importante recordar que no son criterios de diagnóstico.

En la reciente revisión de los criterios ACR/EULAR 2010 se detallan y especifican los parámetros empleados por los clínicos para valorar la evolución de la enfermedad y para determinar si la enfermedad está o no en su fase aguda. Estos parámetros son: número de articulaciones inflamadas y otros síntomas (DAS28), determinación de la positividad para FR y anti-CCP, y análisis de los niveles de PCR o del VSG. Además, tanto la EULAR como el ACR hacen mención de la importancia que tiene considerar las erosiones como un factor crítico para valorar la severidad de la enfermedad.

Los criterios ACR/EULAR 2010 establecen que para que un paciente pueda ser evaluado debe sufrir sinovitis en al menos una articulación sin un diagnóstico que lo justifique. Una vez que se cumpla este requisito se evalúa numéricamente el estado del paciente. Para ello, se analizan cuatro apartados valorados con un número según su peso relativo en el riesgo a padecer AR, y que dan lugar a una cifra entre 1 y 10. Para definir que un paciente tiene un alto riesgo de padecer una AR erosiva en un futuro próximo, éste debe alcanzar una valoración mínima de 6. Los apartados que se evalúan en un paciente y los detalles de puntuación se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Valoración de los parámetros clínicos incluidos en los criterios ACR/EULAR 2010.

Articulaciones afectadas	[0-5]	Serología	[0-3]
Una articulación grande	0	RF y anti-CCP negativos	0
2-10 articulaciones grandes	1	Valor positivo bajo de FR o de anti-CCP	2
1-3 articulaciones pequeñas	2	Valor positivo alto de FR o de anti-CCP	3
4-10 articulaciones pequeñas	3		
>10 articulaciones afectadas, una pequeña	5		

Duración de los síntomas	[0-1]	Elevación de reactantes de fase	[0-1]
<6 semanas	0	No	0
≥6 semanas	1	Sí	1

A la derecha de cada parámetro se observa el valor numérico que adquiere en caso de positividad. Un resultado igual o superior a 6 indica un alto riesgo de padecer AR.

## 4.2. Pruebas de diagnóstico de la AR

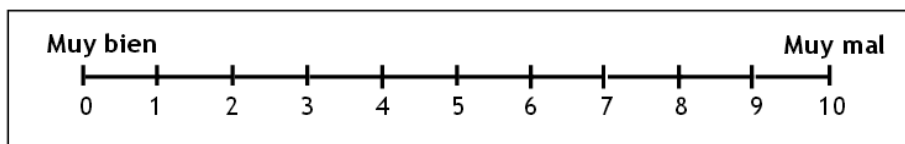
Para un correcto diagnóstico de la AR el reumatólogo necesita disponer de un amplio abanico de herramientas como son la historia del paciente, realizar un examen físico (determinación del valor de DAS28), imágenes de rayos X o de resonancia magnética de las articulaciones afectadas y resultados de pruebas biológicas (PCR, FR, velocidad de sedimentación globular y anti-CCP) [97].

### 4.2.1. *Historia clínica*

La historia clínica recoge antecedentes personales y familiares que serán de gran utilidad para el médico y para establecer un tratamiento adecuado. Conocer la historia previa del paciente resulta de especial interés en los casos de AR precoz. Además, es importante recoger en la historia los datos sobre el estilo de vida y los hábitos del paciente ya que factores como, por ejemplo, el tabaquismo, la actividad física, la dieta o el consumo de alcohol pueden influir en el riesgo a desarrollar ésta y otras enfermedades reumáticas. Además de estos parámetros, los datos sociodemográficos del paciente son indispensables ya que tienen notable valor pronóstico (edad y sexo sobretodo).

La historia clínica nos permite además recoger dos parámetros muy útiles tanto para la clasificación del paciente y de la enfermedad, como para el desarrollo de posibles investigaciones. Los mencionados parámetros son: *la evaluación global de la enfermedad realizada por el enfermo* (EGP) y *la evaluación global de la enfermedad realizada por el médico* (EGM). Para el cálculo de estos parámetros se recomienda el uso de una escala visual analógica (EVA), que es una escala visual y numérica mediante la cual, el paciente o el médico, pueden evaluar numéricamente la gravedad de la enfermedad con valores comprendidos entre 0 y 10 (Figura 4).

**Figura 4.** Escala visual analógica (EVA).



Por otra parte, para evaluar la discapacidad física del paciente, existe un cuestionario específicamente diseñado con este fin y que debe ser cumplimentado por el paciente con la ayuda del clínico. Estos cuestionarios se emplean como parámetros de diagnóstico y para evaluar la progresión de la enfermedad. El uso conjunto de estos cuestionarios con otros parámetros de diagnóstico resulta de enorme utilidad para el desarrollo de tareas de investigación, los más empleados son:

- *Health Assessment Questionnaire* (HAQ). Consta de 20 apartados sobre actividades cotidianas como vestirse, asearse, levantarse, comer, caminar, pasear, alcanzar objetos, etc. [98]. Es el cuestionario más empleado en España, de hecho existe una versión española del original [99].
- *Modified Health Assessment Questionnaire* (MHAQ). Este cuestionario es una versión reducida del HAQ con sólo 8 apartados. También existe una versión española validada y existen versiones más actuales que incluyen más apartados [100, 101].
- *Arthritis Impact Measurements Scales* (AIMS). Es un cuestionario de 9 apartados que ofrece una medida específica del estado físico, emocional y social del paciente con artritis. Existe una versión denominada AIMS2 que incluye una valoración de la funcionalidad de los brazos y profundiza en ciertos aspectos sociales [102].

Estos cuestionarios están correlacionados entre sí, resultando perfectamente válidos y eficaces en cualquiera de sus formatos y, además, están relacionados con el índice de actividad de la enfermedad, con el grado de discapacidad que presenta el enfermo y con la calidad de vida [103].

#### 4.2.2. Pruebas biológicas

- **Reactantes de fase aguda.** Son aquellas proteínas cuya concentración en sangre varía al menos en un 25% cuando existe un proceso inflamatorio, independientemente de su origen:
  - Proteína C-reactiva (PCR). Los niveles de PCR en una analítica de sangre periférica indican el nivel de inflamación. Algunos estudios demuestran que los pacientes que presentan una concentración alta de PCR en sangre durante un largo período de tiempo suelen presentar daños articulares más severos [104].
  - Velocidad de sedimentación globular (VSG). Para su cálculo se extrae una muestra de sangre periférica en un tubo y se miden los glóbulos rojos precipitados tras una hora [104]. La VSG también se denomina índice de sedimentación de los eritrocitos o ESR (acrónimo del inglés *erythrocyte sedimentation rate*).
  - **Factor reumatoide (FR)**. Es un anticuerpo que reacciona contra la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG. Puede ser de los isotipos IgM, IgA o IgG. Es positivo en un 75% de los pacientes de AR, porque durante la enfermedad el sistema inmune produce un ataque contra sí mismo y genera este tipo de auto-anticuerpos. Posee valor pronóstico ya que se asocia a una enfermedad más agresiva, con mayor destrucción articular y más incapacitante. Se considera durante el diagnóstico cuando se testa en pacientes con signos y/o síntomas de AR, ya que es un factor también presente en otras enfermedades autoinmunes. Este factor puede ser positivo antes de que surja la enfermedad y, además, puede volverse negativo en el transcurso de la misma tras una respuesta favorable al tratamiento.
- **Anticuerpos anti-peptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP o ACPA)**. El sistema inmune genera anticuerpos frente a las proteínas citrulinadas durante el proceso autoinmune e inflamatorio que se produce en la AR. La enzima peptidarginil deaminasa produce una modificación post-translacional de la arginina, dando lugar a la citrulina, presente en un alto porcentaje de los pacientes con esta enfermedad. Los anti-CCP pueden preceder a la enfermedad y correlacionan con la severidad de la misma lo que les atribuye un elevado valor pronóstico. Además, los anti-CCP se detectan en el 40% de los pacientes de AR que

son negativos para FR [105, 106]. De hecho, en 2002 Visser y colaboradores publicaron un modelo predictivo de artritis erosiva en el cual los anti-CCP resultan ser un marcador independiente [107].

- **Anticuerpos antinucleares (ANA).** Los ANA son anticuerpos frente a los núcleos celulares cuya concentración se ve elevada en enfermedades como lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren. Se usan para descartar otro tipo de enfermedades autoinmunes.
- **Líquido sinovial.** El líquido sinovial inflamatorio es un factor diagnóstico de artritis, aunque no es específico de AR [97]. Existen ciertos parámetros que permiten confirmar si un líquido sinovial es o no inflamatorio: color amarillo opalescente, entre 2.000 y 50.000 leucocitos/mm<sup>3</sup>, entre 3 y 5 g/dl de proteínas y con un 25% menos de glucosa que en sangre.

#### 4.2.3. Exploración física

Permite evaluar el grado de actividad inflamatoria, de discapacidad funcional y de daño estructural. Durante esta exploración se realiza una evaluación detallada del aparato locomotor y resulta indispensable reconocer signos y síntomas de la AR como son el dolor, la tumefacción, la falta de movilidad, la deformidad de las articulaciones, la presencia de nódulos subcutáneos y alteraciones cutáneas así como la simetría de las articulaciones afectadas entre otros.

La OMERACT (Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials) viene trabajando desde 1992 en la validación de todas las herramientas clínicas disponibles para evaluar el efecto de las intervenciones terapéuticas en las enfermedades reumáticas. La OMERACT junto con la ACR recomiendan que la valoración del dolor realizada durante la exploración física debe ser definida por el propio enfermo (EGP) mediante el uso de una EVA, donde el valor 0 corresponde a la ausencia de dolor y 10 al máximo dolor.

Durante la exploración física se calculan los parámetros que miden el grado de actividad inflamatoria en la AR, denominados *índices de actividad compuestos*:

- **Recuentos complejos.** Se obtiene el número de articulaciones dolorosas y el número de articulaciones tumefactas. Requiere la exploración de 68 articulaciones para el dolor y de 66 para la tumefacción (se excluye la cadera). Son los que más información aportan sobre el estado del paciente.
- **Disease Activity Score (DAS).** Es un índice que permite evaluar la actividad inflamatoria de la enfermedad. Requiere el recuento de 44 articulaciones y se basa en la ausencia o presencia de dolor y/o tumefacción en las articulaciones exploradas. Tiene valores comprendidos entre el 0 y el 10.
- Para calcular el DAS se emplea la siguiente fórmula [108, 109]:

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

v= raíz cuadrada

IR= índice de Ritchie (IR)

NAT44= número de articulaciones tumefactas sobre 44 articulaciones

VSG= velocidad de sedimentación globular

EGP= evaluación global de la enfermedad según el paciente

El DAS es un índice de actividad y se emplea para categorizar la AR en tres niveles según la actividad de la enfermedad (Tabla 5) [97]:

**Tabla 5.** Categorización de la actividad de la enfermedad en función del DAS.

Actividad Baja	DAS <2,4
Actividad Moderada	2,4 <DAS <3,7
Actividad Alta	DAS ≥3,7

- **Disease Activity Score 28 (DAS28).** Es un DAS modificado basado en la exploración y el recuento de 28 articulaciones dolorosas (NAD28) y tumefactas (NAT28). El valore del DAS28 también varía entre 0 y 10 y la EULAR recomienda su uso para la clasificación de la AR [110, 111]. Su fórmula es:

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

NAD28= número de articulaciones dolorosas valorando 28

VSG= velocidad de sedimentación globular

EGP= evaluación global de la enfermedad según el paciente

Los puntos de corte para clasificar la actividad de la AR con el DAS28 son [97]:

**Tabla 6.** Categorización de la actividad de la enfermedad en función del DAS28.

Actividad Baja	DAS28 <3,2
Actividad Moderada	3,2 <DAS28 <5,1
Actividad Alta	DAS28 ≥5,1

**Simplified Disease Activity Index (SDAI).** Este parámetro deriva de un índice desarrollado por Eberl en el año 2000 y su cálculo es el resultado de la suma aritmética de parámetros descritos anteriormente:

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

NAD28= número de articulaciones dolorosas valorando 28

NAT28= número de articulaciones tumefactas valorando 28

EGM= evaluación global de la enfermedad por el médico

EGP= evaluación global de la enfermedad según el paciente

PCR= proteína-C-reactiva

En la práctica clínica se usa este índice con los siguientes puntos de corte para clasificar la enfermedad según el grado de actividad de la misma [97]:

**Tabla 7.** Categorización de la actividad de la enfermedad en función del SDAI.

Actividad Baja	SDAI <20
Actividad Moderada	20 < SDAI <40
Actividad Alta	SDAI ≥40

**Clinical Disease Activity Index (CDAI).** Es un SDAI modificado en el que no se incluye la PCR en la fórmula. Se emplea en aquellas ocasiones en las que no se dispone de datos sobre los reactantes de fase aguda [112].

Los índices de actividad complejos resultan de gran utilidad para los estudios científicos ya que permiten clasificar a los pacientes en función de la severidad de la enfermedad y, además, permiten evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos administrados. Por ello, las investigaciones científicas sobre evolución, severidad o respuesta a tratamientos emplean estos índices para clasificar a los pacientes y elaborar las conclusiones de sus estudios.

Aunque el recuento de articulaciones afectadas lo realiza el reumatólogo basándose en la exploración física y en los signos y síntomas que presenta el paciente, hoy en día existen técnicas que permiten realizar un recuento más preciso. Por ejemplo, la resonancia magnética permite visualizar todas las articulaciones afectadas con un rango de error muy pequeño, pues se observan alteraciones subclínicas que se omitirían en la exploración física [113, 114].

#### 4.2.4. *Pruebas radiológicas y de imagen*

Este tipo de pruebas permiten visualizar el estado de las articulaciones afectadas. Con ellas el reumatólogo mide la erosión y densidad ósea para evaluar el grado de severidad de la enfermedad. Las pruebas radiológicas más importantes y más empleadas son las radiografías de manos y pies. Al daño que puede sufrir una articulación y que se observa mediante imágenes se le denomina *daño radiológico*. Los daños radiológicos pueden surgir y detectarse de forma temprana, en períodos de tan sólo 3 a 6 meses de evolución [115, 116].

**Figura 5.** Imágenes de diagnóstico del daño erosivo provocado por la AR en la articulación de la muñeca.



(a, b) tomografía computarizada (PET-tomografía computarizada); (c, d) T1-resonancia magnética (IRM); (a, c) plano coronal y (b, d) axial; (e) radiografía. Se observa una erosión en el radio distal en todas las imágenes a excepción de la radiografía. La erosión es de grado 1 bajo los criterios de la OMERACT (tomografía computarizada y resonancia magnética) [117].

Aunque la radiografía (Rayos X) es la prueba de imagen más empleada por los reumatólogos para la valoración del enfermo, el inicio de la erosión ósea durante la artritis temprana e indiferenciada no puede detectarse mediante esta técnica. Para la detección de procesos de erosión precoces se utilizan otras técnicas de imagen más sensibles que incrementan la calidad de la imagen obtenida y permiten un mejor análisis de los tejidos blandos [118-120]. Entre estas nuevas técnicas destacan los ultrasonidos, la resonancia magnética (IRM o RNM), la tomografía por emisión de positrones (PET –tomografía computarizada/IRM) y las imágenes ópticas. Todas estas técnicas de imagen ayudan a establecer un diagnóstico precoz de la enfermedad, a

monitorizar la terapia y a predecir las consecuencias de la enfermedad o del tratamiento [121]. En la Figura 5 observamos las erosiones que sufre un paciente de AR en la muñeca mediante diferentes técnicas de imagen [117].

Aunque las últimas conferencias de la OMERACT han concluido que el uso de la radiografía cubre la mayoría de los aspectos necesarios para determinar la severidad y actividad de la enfermedad, se aconseja el uso de la resonancia magnética para el cálculo del RAMRIS (*rheumatoid arthritis magnetic resonance imaging score*) y la categorización del grado de erosión, el edema óseo y la sinovitis [122-124]. En la actualidad, numerosos estudios avalan el uso de estas nuevas técnicas de imagen para mejorar la sensibilidad y especificidad de los criterios del ACR/EULAR 2010 en el diagnóstico de la AR [95, 125-127].

## 5. Tratamiento de la AR

---

En España, el tratamiento de los casos de nuevo diagnóstico genera un coste anual de entre 10.000 y 14.000€ por paciente, dependiendo del tratamiento administrado y de la evolución de la enfermedad [128]. Aunque la introducción en las últimas décadas de los agentes biológicos ha mejorado notablemente el tratamiento de la AR, el elevado porcentaje de fracaso terapéutico y el elevado coste de estos tratamientos han incrementado sustancialmente el impacto socioeconómico de la enfermedad.

### 5.1. Tipos de Tratamientos: Biológicos y No Biológicos

---

#### 5.1.1. Tratamiento de primera elección

El objetivo del tratamiento de la AR es inducir la remisión completa de la enfermedad o, al menos, conseguir un estado de mínima actividad inflamatoria. Bajo esta premisa, los primeros fármacos de elección en las últimas décadas han sido los denominados *fármacos modificadores de enfermedad* (FAMES o DMARDs, *disease-modifying anti-rheumatic drugs*) que tienen como finalidad frenar los signos y síntomas de la enfermedad y retrasar la progresión radiológica de los pacientes con AR. Dado su éxito y su perfil de seguridad, los pacientes normalmente son tratados con un FAME tan pronto como se establece el diagnóstico clínico. La acción de los FAMES se observa entre 3 y 10 semanas posteriores a su administración. Los medicamentos incluidos en este grupo son [129]:

- Metotrexato (MTX): Es el FAME más utilizado y estudiado y actúa inhibiendo a la enzima dihidrofolato reductasa. La dihidrofolato reductasa convierte el dihidrofolato en tetrahidrofolato, el cual es un donador de grupos metilo requerido para la síntesis de purinas, timidina monofosfato y ciertos aminoácidos. Así, cuando el MTX bloquea a ésta enzima impide la síntesis de ácidos nucleicos y en consecuencia ejerce una actividad antiproliferativa en las células que se encuentran en fase S del ciclo celular.
- Leflunomida: Actúa bloqueando la síntesis de pirimidina ya que inhibe selectivamente a la [enzima](#) dihidroorotato deshidrogenasa. Su mayor efecto inmunosupresor se observa en los linfocitos.
- Sulfasalazina: Su principio activo es la mesalazina (*ácido 5-aminosalicílico*), capaz de inhibir a los linfocitos, la síntesis de factores inflamatorios y la absorción de folatos (necesarios en la maduración de las células inmunes).

- Las sales de oro intramusculares (aurotiomalato): Producen una inhibición de la función de los linfocitos y macrófagos.
- Cloroquina e hidroxiclороquina: son fármacos antimaláricos que además presentan una acción antiinflamatoria en las enfermedades autoinmunes. La hidroxiclороquina eleva el pH intracitoplasmático alterando el ensamble de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de manera que interfiere en el procesamiento antigénico y por tanto, disminuye el estímulo autoinmune.
- Ciclosporina: Su acción inmunosupresora procede de su capacidad de unión a la ciclofilina, proteína presente en el citosol de las células T efectoras, lo cual provoca la inhibición de la transcripción y liberación de interleuquinas.
- Penicilamina: Posee un perfil de efectos adversos poco predecible por lo que su administración ha quedado muy restringida.
- Azatioprina: Es un análogo de las purinas que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y que actualmente se encuentra en desuso en el tratamiento de la AR.

Los FAMES más empleados son el metotrexato (MTX), la sulfasalazina, la hidroxiclороquina y la leflunomida, El MTX es el FAME más empleado, ya que tiene una eficacia contrastada y, si se usa adecuadamente, tiene pocos efectos adversos. En algunos pacientes pueden utilizarse los FAMES en combinación. Otros FAMES, como la penicilamina o la azatioprina, ya no se utilizan hoy en día para tratar a los pacientes con AR. En algunos casos los FAMES por sí solos no son capaces de disminuir los síntomas de la enfermedad. En aquellos pacientes más graves será necesario incluir en la terapia glucocorticoides o antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para disminuir los síntomas de la AR[130].

### 5.1.2. Fármacos biológicos

Los agentes biológicos surgen como alternativa a los FAMES debido al alto porcentaje de pacientes que no responden a la terapia, han sido desarrollados en base a los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad y con el objetivo de bloquear la respuesta inmune.

Entre los fármacos biológicos más utilizados se encuentran:

- Fármacos anti-TNF $\alpha$ . El TNF $\alpha$  tiene un papel fundamental en el desencadenamiento y progresión de la AR, así como en la respuesta al tratamiento. Bajo esta premisa, se han desarrollado una serie de agentes biológicos para el tratamiento de esta enfermedad cuyo objetivo es bloquear la vía del TNF $\alpha$  [131]. Son fármacos que inhiben a la molécula TNF $\alpha$ , una sustancia del grupo de las citoquinas que producen las células del sistema inmune y que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria. Los principales fármacos biológicos empleados son Adalimumab, Etanercept, Infliximab, Certolizumab y Golimumab.
- Abatacept. Es un fármaco biológico que impide la estimulación de los linfocitos T mediada por las células presentadoras de antígenos (células presentadoras de antígenos), este agente biológico es un complejo Ig-CTLA4 (inmunoglobulina unida al dominio extracelular del antígeno citotóxico de células T) que se une a la proteína B7 de las células presentadoras de antígenos e impide la coestimulación mediada por la unión B7-CD128 de la célula T.



- Rituximab. Es un anticuerpo monoclonal que se une a la superficie de los linfocitos B causando su muerte.
- Tocilizumab. Es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor de la IL6 bloqueando la capacidad de dicha citoquina para activar la inflamación y el daño tisular.
- Anakinra. Es un antagonista de IL-1RA con efectos menos potentes que los inhibidores de TNF en la mayoría de los pacientes y, por ello, actualmente tiene un uso reducido.

## 5.2. Evaluación de la respuesta terapéutica

Los criterios de respuesta al tratamiento se aplican a cada paciente individualmente y consideran tanto el grado de actividad actual como el cambio en la actividad de la enfermedad. Para ello, la EULAR ha establecido unos criterios de respuesta al tratamiento basándose en el índice DAS28, que se medirá al inicio y a los 6 meses de tratamiento. Bajo los criterios de la EULAR, se pueden clasificar a los pacientes en buenos-, moderados- o no-respondedores (Tabla 8) [110]. En el año 2010 se publicó una revisión de los criterios de respuesta y de actividad de la AR por la EULAR y el ACR [91]. Además de insistir en la clasificación de los pacientes respondedores, en dicha revisión se mencionan los parámetros en los que se basan los clínicos para evaluar la evolución de la enfermedad. Así, los clínicos evalúan las articulaciones inflamadas y otros síntomas (DAS28), hacen un control serológico para ver si los pacientes son positivos para el FR y anti-CCP, y miden la PCR y el VSG para determinar si la AR está en una fase aguda. También, la EULAR y el ACR hacen mención de la importancia de las erosiones en la AR, y muchos estudios han demostrado la equivalencia entre las erosiones y la severidad de la enfermedad.

**Tabla 8.** Clasificación de la respuesta del paciente al tratamiento en función del DAS28.

DAS28 Actual	Disminución del DAS28		
	>1,2	1,2 - 0,6	<0,6
<3,2	Buena Respuesta		
3,2 - 5,1		Respuesta Moderada	
>5,1			No Respuesta

En la parte superior de la tabla se clasifica la variación del DAS28 tras 6 meses de tratamiento y a la izquierda el valor del DAS28 que presenta el paciente en el momento de la valoración clínica.

## 5.3. Diagnóstico de remisión de la AR

No hay que olvidar que la AR es una enfermedad crónica y, por lo tanto, hoy en día no se ha conseguido la curación total de ningún enfermo. No obstante, con una buena respuesta al tratamiento se puede conseguir la remisión del paciente, es decir, la ausencia de actividad de la enfermedad. El ACR estableció unos criterios para definir la remisión de la AR cuando se cumplen 5 de ellos durante un periodo igual o mayor de dos meses [86]. Los criterios del ACR son:

- Ausencia de rigidez matutina o  $\leq 15$  minutos
- Ausencia de cansancio
- Ausencia de dolor articular en la anamnesis
- Ausencia de dolor articular a la presión
- Ausencia de tumefacción sinovial y tenosinovial
- VSG normal

Para mejorar la práctica clínica, se han establecido unos criterios de remisión basados en los índices de actividad. En 1996, Prevoo propuso emplear también el DAS como criterio de remisión, estableciendo el punto de corte cuando el DAS  $<1,6$  [132]. Desde entonces han surgido numerosas propuestas para el uso conjunto de los seis criterios del ACR y los índices de actividad, aunque existe controversia al respecto. El reumatólogo deberá analizar también el estado actual del paciente para emitir una valoración final. Los puntos de corte más aceptados y empleados en la actualidad para definir la remisión de la enfermedad son:

- DAS  $<1,6$  [132]
- DAS28  $<2,6$  [133, 134]

También, el ACR y la EULAR trabajaron en conjunto para desarrollar unos criterios de remisión en el año 2011 [135, 136]. Son los criterios más empleados en la actualidad y para satisfacerlos se debe cumplir que el SDAI sea  $\leq 3,3$  ó las siguientes condiciones:

- SJC  $\leq 1$  (número de articulaciones inflamadas, *swollen joint count*)
- TJC  $\leq 1$  (recuento de articulaciones dolorosas, *tender joint count*)
- PCR (mg/dl)  $\leq 1$
- VGP  $\leq 1$

Estudios realizados en los años 2012 y 2013 sobre el uso de los criterios de remisión ACR/EULAR, mostraban que el criterio de la VGP era muy restrictivo y dejaba fuera a pacientes que sí estaban en remisión. Por ejemplo, Inanc y colaboradores publicaron un estudio en el que describían las situaciones en las que el paciente podría no cumplir los criterios de remisión del ACR/EULAR a causa de la VGP: fatiga, depresión, ansiedad y fibromialgia [137].

Además, hoy en día los biomarcadores y las técnicas de imagen cada vez tienen un mayor peso para su uso conjunto con los criterios de remisión ACR/EULAR [138-140]. Por ejemplo, un estudio reciente del investigador Kisten demuestra la alta sensibilidad y especificidad de las imágenes obtenidas por fluorescencia con el *Rheumascan* para detectar una inflamación subclínica [141]. Así, hoy en día los investigadores instan a los reumatólogos a incluir las técnicas de imagen como criterio de remisión para mejorar los criterios del ACR/EULAR 2011 [142-144]; de hecho, Lillegraven estudió el porcentaje de pacientes que presentan daño tisular a pesar de considerar que se encuentran en remisión bajo los criterios del ACR/EULAR [143]:

20% de los pacientes en remisión según los criterios del ACR/EULAR  
30% de los pacientes en remisión según DAS28-PCR  
24% de los pacientes en remisión según SDAI  
19% de los pacientes en remisión según CDAI

## 6. Patogénesis de la AR

---

### 6.1. Daño Tisular

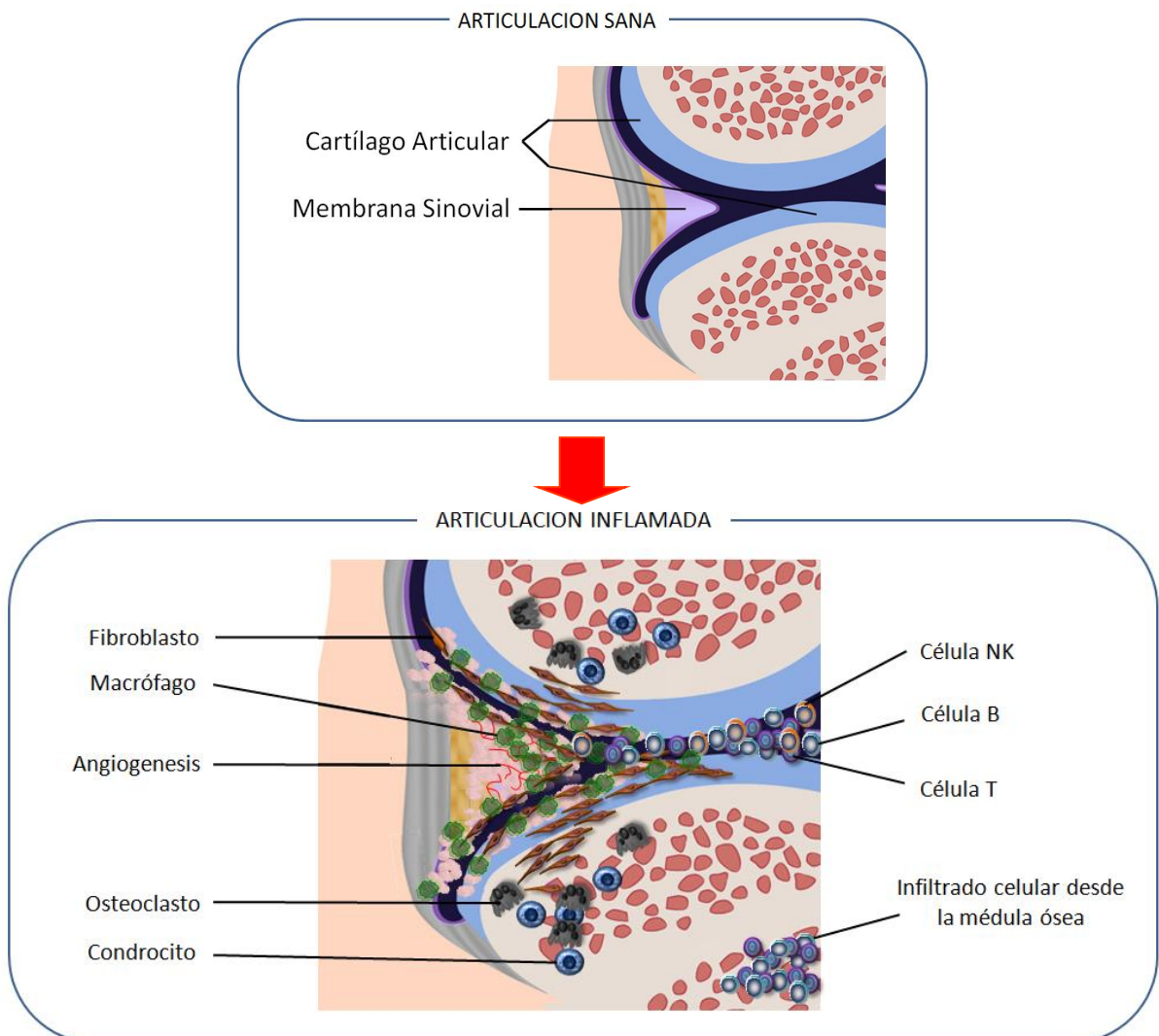
---

A pesar del amplio desconocimiento que aun existe hoy sobre los mecanismos que desencadenan a la AR, está demostrado que la grave sintomatología es consecuencia de una

respuesta inmune exacerbada. La patogénesis de esta enfermedad es muy compleja y envuelve a moléculas y células que participan tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

Cuando aparecen los síntomas clínicos de la enfermedad lo que se produce en la articulación es una inflamación del revestimiento de la misma (denominado sinovio o membrana sinovial), lo cual ocasiona hinchazón, dolor y deformación de la articulación. En condiciones normales, la membrana sinovial está recubierta de una fina capa de fibroblastos y macrófagos en proporciones iguales. Durante la inflamación esta membrana sufre una proliferación celular y se vuelve hiperplásica. El revestimiento superficial de fibroblastos y macrófagos delimita una zona intersticial que sufre un infiltrado celular de fibroblastos sinoviales, macrófagos, mastocitos, células T (CD4 y CD8 positivas), células NK y NK (natural killers), y células plasmáticas. El sinovio inflamado invade el tejido adyacente y promueve la destrucción articular mediada por osteoclastos, condrocitos y fibroblastos sinoviales, los cuales que atacan al cartílago y al tejido. La persistencia de la inflamación del sinovio puede dañar al hueso en el lugar en que se fija al mismo, dando lugar a pequeñas muescas o erosiones. Además, puede provocar daños en los cartílagos, huesos, tendones y ligamentos de las articulaciones. La médula ósea también contiene un infiltrado celular con agregados de linfocitos T y B, por lo que el hueso probablemente sufre un ataque bidireccional.

**Figura 6.** Representación del daño tisular durante la AR. Análisis comparativo de una articulación inflamada y una sana.



Transformación de una articulación sana en una articulación inflamada afectada por la artritis reumatoide tras recibir un infiltrado de células inmunes activadas, así como un ataque bidireccional desde el tejido adyacente y el torrente sanguíneo.

Finalmente, la angiogénesis es una característica propia de las articulaciones afectadas por la AR, ya que el tejido articular es un entorno profundamente hipóxico y la inflamación requiere el reclutamiento de células y mediadores inmunes (Figura 6).

### 6.1.1. Macrófagos

Los macrófagos son células mononucleares con capacidad fagocítica que se originan a partir de los monocitos de la médula ósea que migran hasta el tejido conjuntivo. El papel principal de estas células es la presentación de antígenos, la secreción de citoquinas y quimoquinas así como la eliminación de tejidos dañados.

En la AR, los macrófagos son unas de las células más activas en el sinovio y la severidad de la enfermedad correlaciona con la concentración de los mismos en la articulación inflamada [145]. Recientemente Kelderhouse y colaboradores han sugerido un sistema de prevención de respuesta al tratamiento basado en el nivel de macrófagos que presenta el enfermo en el lugar de la inflamación [146] y suelen ser objetivos diana en la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad [147, 148]. Además, en los modelos animales los niveles de infiltración de macrófagos en el tejido sinovial sirven, junto a otras pruebas, para confirmar que se ha producido la inducción de la enfermedad [149].

La activación de los macrófagos se origina mediante la polarización de los mismos por la vía clásica o la vía alternativa y se denominan M1 ó M2, respectivamente. Los macrófagos M1 poseen una actividad proinflamatoria, mientras que los M2 desencadenan funciones inmunosupresoras y de reparación de tejido dañado. Ambos subtipos de macrófagos se encuentran en desequilibrio en las enfermedades autoinmunes y, en el caso de la AR, predomina el tipo M1 (inducido por la presencia de anticuerpos anti-CCP) [150, 151] que correlaciona con los niveles de inflamación [152] en las articulaciones y que induce la liberación de  $TNF\alpha$ , IL1, IL6, IL12, IL23 y ROS.

Durante el proceso inflamatorio autoinmune que se origina en AR, un porcentaje de los macrófagos se pueden diferenciar a células dendríticas (DCs, de sus siglas en inglés) en el sinovio, convirtiéndose en células con mayor capacidad de activación de linfocitos T y, por tanto, de inducir la liberación de mediadores proinflamatorios y la diferenciación de las células T inmaduras a células Th1 o Th17 [153]. Los macrófagos además pueden ser activados por el complemento, ya sea directamente o a través del receptor Fc de membrana, y por las células Th1 y Th17 mediante contacto directo. Los macrófagos activados en el sinovio secretan quimoquinas (*MCP1*), citoquinas proinflamatorias ( $TNF\alpha$ , IL1 e IL6), y factores de crecimiento (GM-CSF) que promueven la erosión ósea y el daño tisular [145].  $TNF\alpha$ , IL1 e IL6 son algunas de las citoquinas secretadas por los macrófagos y son, en parte, responsables de las manifestaciones clínicas que aparecen en pacientes con AR. Son capaces de activar a los condrocitos y osteoclastos e inducen la activación y diferenciación de las células T y B inmaduras. Por otra parte, los macrófagos pueden verse afectados por la presencia de anticuerpos anti-CCP y FR. Los anti-CCP de tipo IgG (anti-CCP-IC) inducen a los macrófagos a secretar  $TNF\alpha$  a través de la vía del  $Fc\gamma R$  mientras que el FR de tipo IgM incrementa la secreción de  $TNF\alpha$  y, además, potencia la liberación de citoquinas proinflamatorias a través de la interacción de la IgG- $Fc\gamma R$  de los anti-CCP-IC (IL1 $\beta$ , IL6, IL8) (Figura 7) [154].

Aunque una de las funciones clásicas de los macrófagos es la reparación del tejido dañado, esta función no parece ser muy relevante en el cartílago o tejido óseo de las articulaciones afectadas en AR. Los macrófagos, no actúan como efectores directos de la destrucción tisular, liberan citoquinas proinflamatorias que activan la liberación de matrix metaloproteinasas (MMPs) y activan a los fibroblastos y osteoclastos. Las MMPs y los fibroblastos provocan la degradación del cartílago, mientras que los osteoclastos destruyen el tejido óseo [145].

### 6.1.2. *Células dendríticas*

Las DCs son células inmunes de la serie blanca que deben su nombre a las proyecciones citoplasmáticas (dendritas) que le confieren una forma estrellada. Las DCs tienen funciones tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, pues son capaces de fagocitar, de presentar antígenos y de liberar mediadores de la respuesta inmune. Su principal función en la respuesta inmune es la presentación de antígenos, ya sean antígenos propios o extraños. Las DCs reconocen a los antígenos gracias a sus receptores de membrana (como los TLR o las Lectinas tipo C), los integra por fagocitosis, los procesa y se los presenta a los linfocitos T provocando la activación y proliferación de los mismos. Para realizar sus funciones antigénicas, las DCs expresan receptores y moléculas de membrana que reconocen, integran o presentan a los antígenos; concretamente, se caracterizan por una alta expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del tipo II (péptido-CMH-II o MHC-II), a través de las cuales realizan la presentación del antígeno procesado. Las DCs también pueden ser activadas por citoquinas proinflamatorias secretadas por otras células inmunes como, por ejemplo, los fibroblastos, los linfocitos B o las células epiteliales. Una vez activadas, las DCs maduran y sobreexpresan ciertas moléculas de membrana destinadas a presentar el antígeno o desencadenar la respuesta inmune y reducen la expresión de receptores para reconocer antígenos. Cabe destacar una mayor expresión de factores coestimuladores como CD80, CD86 y CD40, de receptores de quimoquinas como CXCR4 y CCR7 y de las ya mencionadas moléculas MHC-II. Además, las DCs activadas secretan citoquinas proinflamatorias que inducen la activación y diferenciación de otras células inmunes efectoras [155].

Durante el proceso autoinmune que caracteriza a la AR, las DCs del tejido sinovial actúan principalmente como APCs capaces de inducir la diferenciación de las células Th0 a células Th1 o Th17 maduras. Las DCs activadas del sinovio tienen aumentada la expresión de moléculas de membrana que intervienen en la respuesta inmune inflamatoria: además de las moléculas de membrana anteriormente mencionada las DCs además expresan el receptor RelB, un complejo de receptor y ligando que activan la vía NFκB (RANK-RANKL) [155]. Entre las lectinas tipo C que expresan las DCs están la *Dectina-1* y la *Dectina-2* y *DC-SIGN* que regulan la activación de las células T en el sinovio (por los monocitos) y la osteoclastogénesis (por acción de las células Th17; Figura 7). 6).

Según la distribución de las DCs en los diferentes tejidos, el fenotipo y la función que desempeñan, podemos clasificar a las DCs en mieloides (mDCs), plasmacitoides (pDCs) o derivadas de monocitos (mo-DCs) [156]. Las mDCs y las pDCs tienen un precursor común, en cambio, las mo-DCs son DCs inflamatorias derivadas de monocitos CD14<sup>+</sup> que desde el torrente sanguíneo se dirigen y concentran en el tejido inflamado [155]. Las mDC también son denominadas células dendríticas convencionales (DCs), y fueron las primeras descritas en el sinovio inflamado de la AR, mostrando una alta expresión de las moléculas MHC-I y -II y de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T. Se ha demostrado que los diferentes subtipos de DCs son capaces de perpetuar la respuesta inmune inflamatoria en la AR mediante la secreción de distintas citoquinas. Así, las mDCs (subtipo CD16<sup>+</sup>) liberan grandes cantidades de TNF, una de las

citoquinas proinflamatorias más importantes en la patogénesis de esta enfermedad. Además, las mDCs (subtipo CD<sub>1c</sub><sup>+</sup>) liberan IL12 e IL18 que inducen a los linfocitos T memoria (CD<sub>4</sub><sup>+</sup> y CD<sub>8</sub><sup>+</sup>) a secretar IFN $\alpha$ . Las pDCs también secretan IFN $\alpha$ , ayudando así a la maduración de las células B para producir auto-anticuerpos. La liberación de IL18 por parte de las pDCs además facilita el reclutamiento de más pDCs hacia el sinovio. Ambas, mDCs y pDCs, secretan IL15 que induce la proliferación de las células B y T. Cabe destacar además que tanto las mDCs como las pDCs liberan IL23p19 en el tejido sinovial. Esta interleuquina estimula la proliferación de las células Th17, dando lugar a un incremento en la respuesta autoinmune que origina esta enfermedad [157]. Un reciente estudio desarrollado por Segura y colaboradores (2013) demostró que las DCs localizadas en el tejido inflamado son eminentemente mo-DCs que estimulan a las células T-CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de memoria, que a su vez liberan IL17 e inducen la respuesta inmune inflamatoria mediada por las células Th17 [158].

Las crecientes evidencias del papel que juegan las DCs en el desencadenamiento y mantenimiento de la respuesta inmune en la AR han animado a la comunidad científica a dedicar grandes esfuerzos para el desarrollo de nuevas terapias basadas en el uso de DCs tolerogénicas. Para ello, se han diferenciado *ex vivo* DCs a partir de precursores como los monocitos, a continuación dotan a éstas células de propiedades tolerogénicas con los autoantígenos adecuados. El objetivo final es inocular al paciente las DCs tolerogénicas para restaurar y normalizar la respuesta inmune [155].

### 6.1.3. Fibroblastos

Los fibroblastos son células fusiformes con un núcleo pequeño y que forman una estructura entramada denominada estroma. Los fibroblastos son un tipo celular del tejido conjuntivo que sintetiza fibras y que mantiene la matriz extracelular sintetizando colágeno y glucosaminoglucanos.

Los fibroblastos se encuentran en la membrana sinovial formando una fina capa que delimita el sinovio articular dando lugar a los denominados *fibroblast-like synoviocytes* (FLS). Durante la inflamación desencadenada en la AR, los FLS multiplican su número y comienzan a invadir el líquido sinovial y el tejido adyacente, destruyendo el cartílago y el tejido óseo. Existen evidencias de que esta expansión celular de los fibroblastos provoca una inhibición de los mecanismos pro-apoptóticos, por ejemplo, se activa la vía NF $\kappa$ B y la expresión de factores anti-apoptóticos [159]. Cabe destacar que, a su vez, la vía NF $\kappa$ B estimula la supervivencia y proliferación de los FLS [160]. Los fibroblastos provocan el daño del tejido articular con la liberación de MMP y catepsinas que degradan el cartílago y el tejido óseo adyacentes. Por otro lado, los fibroblastos secretan RANKL y DKK1 (Dickkopf-1) y, como consecuencia, promueven la diferenciación de los osteoclastos desde sus precursores (vía RANK-RANKL) e inhiben la diferenciación a osteocitos (vía Wnt, mediante DKK1), promoviendo así la destrucción ósea. En la AR, los fibroblastos mantienen la cronicidad de la inflamación al provocar una mayor expresión de quimioquinas que atraen a células inmunes a la articulación inflamada (CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL5 Y CXCL1), como por ejemplo a los leucocitos. Estas quimioquinas y otros factores secretados por los fibroblastos, no sólo atraen a las células inmunes, sino que además las retienen y promueven su supervivencia con funciones anti-apoptóticas (Figura 7) [161].

### 6.1.4. Células T

La presencia de infiltrados inflamatorios y estructuras foliculares en la membrana sinovial durante diferentes fases de progresión de la AR sugiere que los linfocitos T estimulados por ciertos

antígenos pueden jugar un papel importante en la enfermedad a través de su interacción tanto con linfocitos B como con células dendríticas foliculares. La interacción con las APCs en el sinovio hace las células T proliferen y secreten citoquinas proinflamatorias y quimoquinas que incrementan la respuesta inflamatoria y atraen a otras células inmunes. Por otra parte, la interacción entre linfocitos T y B estimula la producción de anticuerpos específicos y, de ese modo, la formación de inmunocomplejos que exacerban de la respuesta inmune inflamatoria. Además, algunos tipos de células T pueden presentar actividad citotóxica induciendo apoptosis o incluso la activación de células mesenquimales que estimulan una respuesta inmune Th2.

### *Linfocitos T cooperadores o células T helper*

Las células T helper son los linfocitos CD<sub>4</sub><sup>+</sup> que inician una respuesta inmune en cascada tras su interacción con el MHC-II de las APCs. Una vez activados se diferencian en células Th1, Th2 y Th17. Los Th1 poseen una función proinflamatoria, principalmente activando a los macrófagos y secretando IFN $\gamma$ . Los Th17 también desencadenan una respuesta inmune inflamatoria y son fundamentales en la patogénesis de la AR ya que secretan IL17 e IL22. Las Th2 interactúan con los linfocitos B y los mastocitos y liberan principalmente IL4 e IL5 dando lugar a una respuesta antiinflamatoria que en la AR se ve disminuida.

En la AR, los efectos inmunes más importantes derivados de las células T son los provocados por las células Th1 y Th17, que estimulan a los macrófagos mediante contacto directo para que secreten citoquinas proinflamatorias. Las células Th17 además estimulan la maduración de los osteoclastos que puede ser inhibida por las células Th1 y Th2. Las células Th17 liberan las citoquinas que promueven la diferenciación del osteoclasto (TNF $\alpha$ , IL1 e IL17) y, por el contrario, las células Th2 secretan citoquinas que inhibe la maduración del osteoclasto (IL4 e IL10). Además, las células Th1 también expresan citoquinas esenciales para la diferenciación del osteoclasto (RANKL y GM-CSF) mientras que tanto las células Th1 como las Th17 median la producción de IL1 e IL17 que inducen a los condrocitos a sintetizar las enzimas responsables de la degradación de la matriz, las MMPs (Figura 7) [162].

### *Linfocitos T citotóxicos*

Aunque el papel de los linfocitos T-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> en AR es controvertido, recientes estudios han sugerido que los linfocitos T-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> pueden ser responsables del establecimiento de infiltrados inflamatorios difusos y de los centros germinales observados en el sinovio de aproximadamente el 50% de los pacientes con AR, los cuales parecen ser necesarios para el establecimiento y, sobretodo, la cronificación de la enfermedad [163]. Cuando los linfocitos T-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> nativos entran en contacto con ciertos antígenos se diferencian a linfocitos T-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> efectoros y efectoros de memoria que, ante un eventual nuevo encuentro con dichos antígenos, son capaces de desplegar una actividad citotóxica mediada por lisis directa tras la liberación de perforina o granzimas o a través de la inducción de la apoptosis por mecanismos que implican la vía de FasL/Fas. Además, los linfocitos T-CD<sub>8</sub><sup>+</sup> parecen jugar un papel clave implicados en la degradación de la matriz del cartílago, mediando la muerte celular de los condrocitos.

### *Células T Reguladoras*

Las células T Reguladoras (T<sub>reg</sub>) expresan CD4 y CD25 y se encargan de modular la respuesta inmune, ya sea a través de un contacto directo célula-célula (mediado por marcadores de membrana), de la liberación de citoquinas como IL10 o TGF $\beta$  o mediando la citotoxicidad de células T auto-reactivas (células T maduras y activas) [164]. Aunque la función de las células Th1 y

Th17 e incluso APCs está fisiológicamente regulada por las células Treg, éstas no presentan niveles óptimos de funcionamiento en los pacientes con AR y su número varía debido probablemente al efecto de inhibición de las citoquinas proinflamatorias. No obstante, las células T<sub>reg</sub> tienen un papel esencial en la prevención de la acumulación de clones auto-reactivos o poli-reactivos de las células B, cuya acumulación se observa frecuentemente en la sangre periférica de los pacientes de AR [165, 166].

### *Células T Natural Killer (NK)*

Las células NKT constituyen el tercer tipo más abundante de linfocitos y modulan la respuesta inmune mediante mecanismos que incluyen la liberación de citoquinas proinflamatorias, el contacto directo célula-célula y la citotoxicidad directa de otros tipos celulares pero además mecanismos de tolerancia inmunológica [167]. La actividad de la célula NKT viene determinada por el balance de la expresión de una amplia gama de receptores activadores (dímeros CD94 y NKG2C, NKG2D o NKG2E) e inhibidores (KIRs, CD94/NKG2A, LIR-1/ILT2).

En el sinovio de las articulaciones afectadas de los pacientes de AR existe un aumento de células NKT CD56<sup>bright</sup> capaces de producir citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$  y IFN $\gamma$ ), activar la citotoxicidad mediada por anticuerpos, activar la síntesis de citoquinas proinflamatorias por monocitos o fibroblastos (IL12, IL15, IL18) e incluso estimular la maduración de células dendríticas y su citotoxicidad y la coestimulación entre células T y B a través de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, OX40, CD70 y CD86 [167]. Las NKT además juegan un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis a través de un mecanismo dependiente de RANKL y M-CSF. Sin embargo, estas células también son capaces de inducir mecanismos protectivos en AR ya que pueden inducir la citotoxicidad de tipos celulares especialmente reactivos como las células T activadas y los macrófagos [167, 168].

### *6.1.5. Células B*

Los linfocitos B generan anticuerpos específicos frente a los antígenos. Se caracterizan por expresar en membrana el receptor de linfocitos B (BCR) y pueden ser activadas directa o indirectamente por las células T, o por células presentadoras de antígenos. Una vez activadas, las células B proliferan y se diferencian a células plasmáticas. Diversos ensayos en modelos murinos con deficiencia de células B han demostrado que estos linfocitos tienen un papel muy relevante en la respuesta inmune que se produce en la AR [169-171]. En enfermedades autoinmunes, las células B presentan un exceso de poli-reactividad, mediado por el sistema BCR/TLR [172-174] por lo que han sido identificadas como dianas terapéuticas para el tratamiento de la AR (depleción de las células B, BCDT) [175].

En la AR, las células T activadas durante la inflamación ayudan a las células B a producir anticuerpos (Ac) específicos que se unen a los antígenos (Ag). Los inmunocomplejos Ac-Ag provocan una exacerbación de la respuesta inmune inflamatoria a través, entre otras vías, de la activación directa (a través de receptores específicos del complemento) o indirecta del complemento (por unión al receptor Fc de los macrófagos). Una vez activada la cascada del complemento se induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 que son responsables, al menos en parte, de las manifestaciones clínicas de la AR, del daño tisular y la activación y diferenciación de las células B y T. Es importante además destacar que las células B a su vez también son capaces de activar a las células T e inducir su maduración y la producción de otras citoquinas proinflamatorias. Además, los linfocitos B secretan citoquinas (IL1, IL6, IL10, TNF $\alpha$  e IL17) que afectan a otras células que intervienen en los mecanismos etiopatogénicos de la AR



como neutrófilos, macrófagos y células efectoras del daño tisular. Otra función relevante de las células plasmáticas es la de reconocer las proteínas citrulinadas y secretar los anticuerpos frente a las mismas (anti-CCP)[176], así como sintetizar el FR tras reconocer antígenos externos [177]. Ambos tipos de anticuerpos son característicos de la enfermedad y están asociados con los niveles de severidad de la misma. Los linfocitos B además son capaces de activar la osteoclastogénesis mediante los autoanticuerpos y la secreción de RANKL (Figura 7)[178, 179].

#### 6.1.6. Neutrófilos

Los neutrófilos son células polimorfonucleares (PMNs) con una enorme capacidad citotóxica debida a su capacidad por liberar enzimas degradadoras (elastasa, gelatinasa, lactoferrina, mieloperoxidasa, colagenasa, etc...) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Los neutrófilos son las primeras células en llegar al tejido inflamado y las primeras en expresar moléculas inmunomoduladoras que contribuyen tanto a las señales activadas por citoquinas y quimioquinas (IL8 e INF $\gamma$ ) como a la regulación de la respuesta inmune a través de la modulación de las interacciones célula-célula [180]. El rango de citoquinas y quimioquinas liberadas por los neutrófilos es enorme y son capaces de regular casi cualquier tipo celular del sistema inmune (células T, células B, DCs, NKTs y macrófagos). Además, a través de la expresión de MHC-II son capaces de expresar antígenos y activar células T o células NKT y liberar proteasas que, a su vez, inducen la liberación de otras citoquinas. En los pacientes con AR, los neutrófilos son capaces de producir altos niveles de ROS o TNF $\alpha$  y parecen ser reponsables en gran medida del daño tisular que se produce en las articulaciones. Además, los neutrófilos son capaces de activar la producción de RANKL y BAFF que están implicados en la activación de la osteoclastogénesis y los linfocitos B que suele ser de mayor magnitud en aquellos pacientes positivos para los anti-CCP y el FR (Figura 7) [181].

#### 6.1.7. Basófilos

Los basófilos en presencia de ciertos alérgenos son capaces de inducir una respuesta inmune Th2 e inhibir la respuesta Th1 a través de la rápida liberación de citoquinas anti-inflamatorias (IL4, IL13 y linfopoyetina estromal tímica) o la presentación antigénica. Sin embargo, se desconoce si los basófilos poseen esa capacidad en ausencia de un antígeno específico de IgE como ocurriría en una eventual primera exposición a un antígeno dado. En AR parece que los basófilos más que inducir una inmunidad Th2 son capaces de migrar a nódulos linfáticos y activarse para contribuir al desarrollo de una respuesta inmune inflamatoria. A través de un contacto directo con células B, los basófilos son capaces de estimular la producción de anticuerpos y la formación de inmunocomplejos, procesos clave en el desencadenamiento de la AR [182]. Aunque los pacientes de AR adultos presentan bajos niveles de basófilos y una respuesta eminentemente Th1, los pacientes con AR juvenil presentan altos niveles de basófilos lo que parece indicar que éstas células puedan tener un papel relevante en los estadios tempranos de la enfermedad más que en fases tardías de la misma [183].

#### 6.1.8. Monocitos

Los monocitos juegan un papel central en el control de la inflamación y han sido muy estudiados en el contexto de enfermedades inflamatorias como la AR. En pacientes con AR los monocitos están activados e infiltran masivamente los sitios inflamados liberando citoquinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$ , la IL6 o el TNF $\alpha$  que exacerban la respuesta inmune y la destrucción tisular del sinovio [184]. Los monocitos CD14<sup>bright</sup>/CD16<sup>+</sup> son un subtipo celular muy abundante en sangre

periférica de pacientes con AR y tras su interacción con células T son capaces de estimular la diferenciación de las células Th0 a Th17 contribuyendo así a la amplificación de la inflamación. Debido a su destacado papel en la síntesis del TNF $\alpha$  incluso a nivel de membrana (tmTNF), los monocitos han sido considerados como posibles dianas terapéuticas (Abatacept, anti-CTLA4) y han sido implicados en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  [185], especialmente en aquellos pacientes que presentan anticuerpos anti-CCP [186]. Además de su papel en la inmunidad los monocitos son importantes en la aparición de erosiones óseas ya que son capaces de transformarse rápidamente en osteoclastos en los pacientes con AR conduciendo así a un incremento de la reabsorción del hueso [187]. Los monocitos además parecen estar implicados en el desarrollo de complicaciones clínicas como las ECV en los pacientes con AR a través de su implicación en el control de aterogénesis (Figura 7) [179, 188, 189].

#### 6.1.9. Osteoblastos y osteoclastos

Los osteoblastos (OBs) y los osteoclastos (OCs) son las células encargadas de la renovación y remodelación del tejido óseo. Una correcta interacción entre ambos tipos celulares resulta esencial para el mantenimiento de una estructura ósea estable. Durante el desarrollo de la AR, los OCs son mucho más activos que los OBs y parecen tener un papel esencial en la destrucción del tejido óseo colindante al sinovio inflamado [190]. Los pacientes con AR presentan mayores tasas de formación de OCs y mayores niveles de células precursoras que los individuos sanos y, también, sus OCs presentan menos apoptosis [190]. Ésto parece explicarse por el hecho de que, durante el proceso inflamatorio que ocurre en AR, las células Th1 y los fibroblastos sinoviales secretan las citoquinas esenciales en la diferenciación del osteoclasto a partir de sus células precursoras: RANKL y GM-CSF (factor de estimulación de colonias de macrófagos). Además de RANKL y GM-CSF, existen otras citoquinas implicadas en la diferenciación de los OCs y su posterior activación como son el TNF $\alpha$  y las interleuquinas IL1, IL7 (secretada por fibroblastos) e IL17 (secretada por las células Th17) (Figura 7). Por otro lado, la diferenciación de los OBs está inhibida por la acción de las células Th2, que liberan IL4 e IL10, y por el GM-CSF e IFNG liberados por las células Th1 [191, 192].

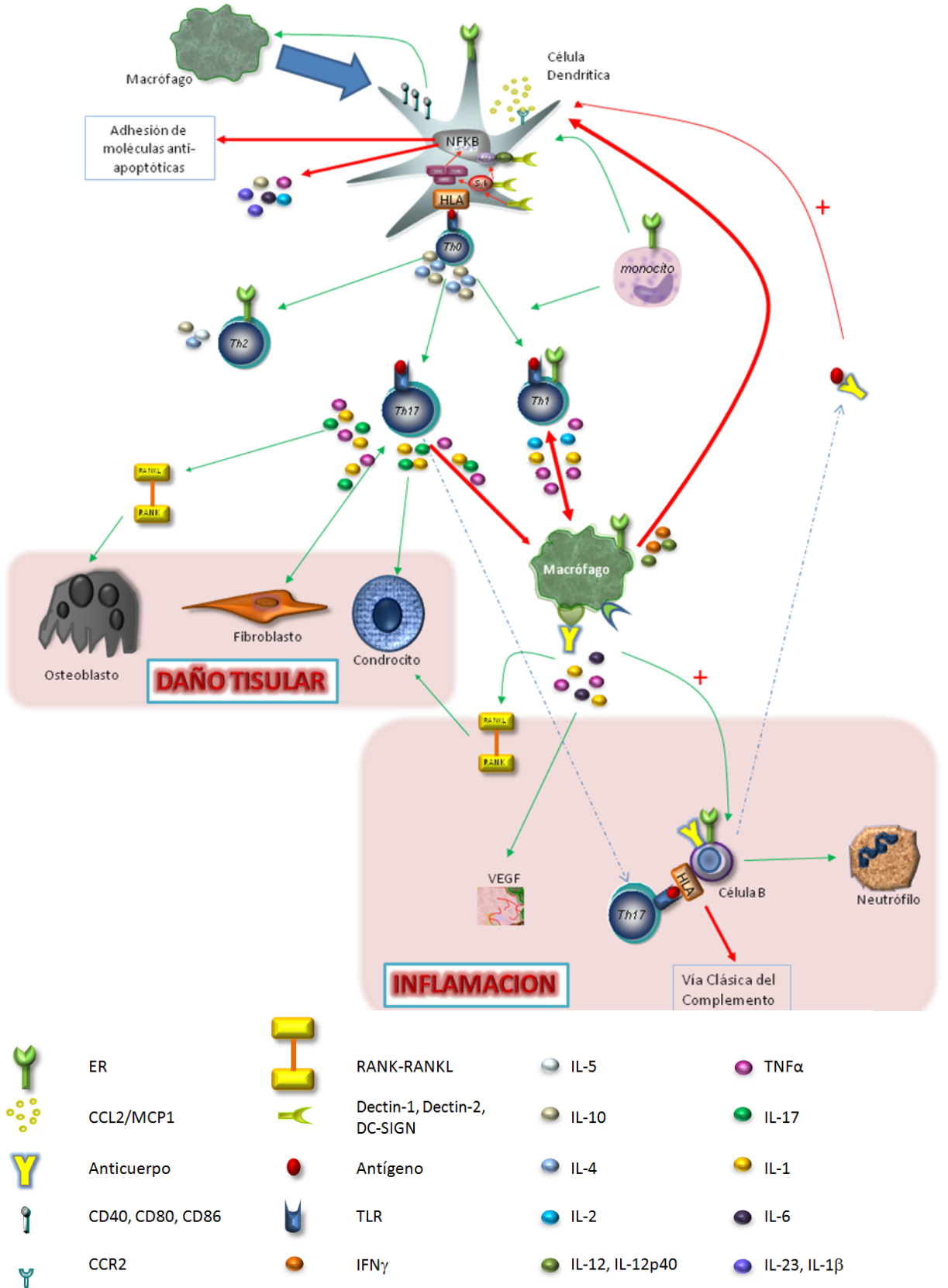
#### 6.1.10. Mastocitos

Los mastocitos son células mieloides del tejido conjuntivo capaces de sintetizar y almacenar histamina y heparina. Se activan por la unión a los anticuerpos que el sistema inmune ha generado frente a los antígenos. Una vez activados liberan el contenido de sus gránulos, lo cual incrementa el proceso inflamatorio. Durante la AR los mastocitos son capaces de liberar mediadores de la inflamación y factores clave para la erosión ósea, como son la IL1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y RANKL [193]. Además, los mastocitos inducen la expresión y activación de las enzimas destructoras de la matriz, como las MMPs y las colagenasas [194].

#### 6.1.11. Condrocitos

Los condrocitos son las células del cartílago que producen colágeno y proteoglicanos para mantener la matriz cartilaginosa. Los condrocitos son dependientes del ambiente químico y mecánico y reaccionan frente a mediadores proinflamatorios, hormonas (fundamentalmente estrógenos) ciertos factores de crecimiento. Por ejemplo, los estrógenos pueden inhibir la actividad catabólica de las proteasas dentro de la matriz extracelular de condrocitos [195]. Durante el desarrollo de la AR, los condrocitos son atacados por células T y por células NKT y, como consecuencia de ese ataque, no son capaces de mantener la integridad de la matriz del cartílago y entran en apoptosis.

**Figura 7.** Esquema de la respuesta inmune inflamatoria subyacente a la AR.



Los macrófagos se diferencian en células dendríticas presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos, ya sean macrófagos o células dendríticas, estimulan a las células Th0 y éstas se diferencian en células Th1 y Th17 secretoras de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas proinflamatorias promueven el daño tisular mediado por fibroblastos, osteoclastos y condrocitos. Los macrófagos son estimulados por las citoquinas liberadas por las células Th1 y Th17 provocando una retroalimentación positiva de la respuesta inflamatoria; estos macrófagos activados estimulan la respuesta inmune de las células B, la producción de autoanticuerpos, la activación de condrocitos y neutrófilos y la angiogénesis. Existe una retroalimentación positiva de la respuesta inmune proinflamatoria por los complejos anticuerpo-antígeno y las células inmunes efectoras. La vía de las Treg y las Th2 está disminuida en la AR.

## 6.2. Citoquinas Relevantes en la Patogénesis de la AR

---

El desequilibrio en la respuesta inmune que ocurre en la AR es consecuencia del desbalance entre la síntesis de citoquinas pro y anti-inflamatorias, la expresión de ciertas quimioquinas y la generación de autoanticuerpos que culmina en la activación de células efectoras, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos del sinovio [192, 196]. Aunque todavía se desconocen en gran medida los mecanismos etiopatogénicos que dan lugar al desarrollo de la enfermedad, hoy se reconoce que la exacerbación y cronificación de la respuesta inmune en AR se produce como consecuencia de la predominancia de citoquinas proinflamatorias en el sinovio y el tejido adyacente.

### 6.2.1. *TNF $\alpha$*

Entre todas las citoquinas proinflamatorias, el TNF $\alpha$  tiene un papel fundamental en la etiopatogenia de la enfermedad. Tanto es así que se han desarrollado diferentes fármacos para el bloqueo de dicha citoquina y que han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la enfermedad. El TNF $\alpha$  es producido por una amplia variedad de células implicadas en la respuesta inmune y el daño tisular (monocitos, macrófagos, células T y B, fibroblastos y células endoteliales) e induce procesos como la presentación antigénica, la diferenciación de las células dendríticas, la angiogénesis y la producción de quimioquinas con la consecuente atracción de células inmunes hacia el sinovio. El TNF $\alpha$ , a través de la inducción de la producción de RANKL es, además, capaz de inducir la diferenciación y maduración de los OCs e inhibir la diferenciación de los OBs.

### 6.2.2. *IL17*

La IL17 también es una citoquina proinflamatoria con un papel relevante en la AR y sus niveles en las articulaciones correlacionan con severidad de la enfermedad. Es secretada por las células Th17, mastocitos y otras células inmunes. Su receptor tiene una expresión ubicua y cuando es activado por la IL17 provoca que los fibroblastos y las células endoteliales y epiteliales secreten citoquinas, quimioquinas y prostaglandinas. La IL17 también induce un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular. Además, la IL17 activa a los macrófagos los cuales secretan TNF $\alpha$  amplificando la inflamación. Y, a través del sistema RANK-RANKL, la IL17 puede tener un impacto positivo en la osteoclastogénesis.

Recientemente, Fischer ha demostrado el papel clave de IL17 y del TNF $\alpha$ , pues ha demostrado que un uso combinado de la inhibición de la vía de ambas citoquinas tiene efectos sinérgicos en la supresión de la inflamación y del daño tisular [197]. Asimismo, la IL17 se ha convertido en el objetivo de una nueva terapia evaluada por múltiples estudios clínicos y que emplea anticuerpos anti-IL17. Estos recientes estudios muestran que los agentes anti-IL-17 son eficaces en el tratamiento de RA sin aumentar los efectos adversos; sin embargo, los resultados están limitados por la heterogeneidad significativa y la corta duración de los estudios [198].

### 6.2.3. IL1

La IL1 activa a osteoclastos, condrocitos, moléculas de adhesión de células endoteliales y a los fibroblastos de manera que éstos últimos incrementan la liberación de citoquinas, quemoquinas, iNOS, prostanglandinas y MMPs [192, 199, 200]. Los efectos de IL1 pueden resultar bloqueados por la acción del inhibidor endógeno IL1Ra y en los pacientes de AR se ha observado que existe un desbalance entre los niveles de ambas citoquinas [201]. Dado el papel de IL1 en AR, en 2006 se autorizó el uso de un fármaco (anakinra) antagonista del receptor (IL-1Ra) para el tratamiento de la AR, aunque actualmente este fármaco tiene un uso reducido debido a que sus efectos son superados por los inhibidores de TNF $\alpha$  [202].

### 6.2.4. IL4

La IL4 es una de las citoquinas más importantes en la diferenciación de las células Th2 a partir de las células Th0, generando, además, una retroalimentación positiva dado que las células Th2 secretan IL4. Es una citoquina antiinflamatoria que inhibe la secreción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por parte de los fibroblastos y PBMCs [199]. En estudios in vitro han demostrado que la IL-4 reduce la resorción del hueso mediante una acción directa sobre los osteoclastos y la producción de MMPs. Los estudios en modelos animales han demostrado el efecto supresor de esta citoquina en las articulaciones al bloquear la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6)[199, 203].

### 6.2.5. IL6

Los efectos de la IL6 en AR son similares a los del TNF $\alpha$  en el entorno sinovial local [204]. Así, la IL6 estimula la diferenciación de los osteoclastos a través de RANKL, activa la secreción de VEGF y promueve la destrucción tisular mediada por los neutrófilos a través de la secreción de NOS y enzimas proteolíticas [199]. Existen dos subunidades solubles del receptor de IL-6, IL-6R y el co-receptor gp130, y algunos estudios han demostrados que la acción pro-inflamatoria de IL6 requiere la implicación de ambas subunidades en una activación de la señalización por la vía *trans* [204].

### 6.2.6. IL12

La IL12 estimula la producción de IFN $\gamma$  y, consecuentemente, la diferenciación de las células Th1. Esta citoquina también incrementa la acción citotóxica de las células T CD8+ y NK. Además, la IL12 activa la producción de otras citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-6 [200].

### 6.2.7. IFN

Los distintos tipos de interferones son igualmente detectados y funcionalmente activos en RA. Estas citoquinas median la regulación inmune de los leucocitos. El IFN tipo I es biológicamente activo en el sinovio de los pacientes de AR y los elementos de respuesta al interferón (IRES) ofrecen utilidad pronóstica para algunas terapias biológicas [200].

### 6.2.8. GM-CSF

El GM-CSF provoca la activación de macrófagos, neutrófilos y DCs, así como la diferenciación de las DCs a un fenotipo inflamatorio. La administración de GM-CSF para corregir la neutropenia en los pacientes con AR promueve la exacerbación de la enfermedad; sin embargo, la administración

de un inhibidor de su receptor- $\alpha$  (mavrilimumab) muestra una eficacia similar al bloqueo de la vía TNF $\alpha$  [205].

### 6.3.El papel de las hormonas esteroideas en la respuesta inmune inflamatoria

---

La mayoría de las enfermedades autoinmunes presentan una mayor prevalencia en mujeres que en hombres y éstas suelen presentar peor pronóstico con manifestaciones clínicas más agresivas [206]. Estos datos sugieren que las hormonas esteroideas pueden jugar un papel en la modulación de la respuesta inmune. Los primeros estudios que evaluaron este aspecto datan de 1979 [207] y, en parte debido a estos primeros estudios pero también a un gran número de estudios experimentales posteriores [208-212], hoy sabemos que las hormonas esteroideas juegan un papel muy relevante en el desencadenamiento de la enfermedad pero también en su control y evolución.

#### 6.3.1. *Las hormonas esteroideas*

Las hormonas esteroideas son compuestos orgánicos que desempeñan funciones reguladoras, estructurales (forman parte de la membrana plasmática junto con los fosfolípidos) y hormonales. Todas las hormonas esteroideas derivan del colesterol, lo cual explica el carácter lipofílico de las mismas y su capacidad para atravesar la membrana plasmática. Las hormonas esteroideas ejercen su actividad mediante su unión a un receptor intracelular dando lugar a un complejo hormona-receptor que es capaz de unirse a una secuencia específica del ADN (elemento de respuesta hormonal o HRE) y modular la transcripción de determinados genes.

Las hormonas esteroideas naturales son las hormonas sexuales femeninas (progestágenos y estrógenos), las hormonas sexuales masculinas (andrógenos: testosterona, androsterona y androstenediona) y la vitamina D y sus derivados. Las hormonas sexuales son sintetizadas en las gónadas y en las glándulas suprarrenales desde donde son transportadas a la sangre mediante la unión a una globulina específica (globulina fijadora de hormonas sexuales o globulina fijadora de cortisol).

Todas las hormonas esteroideas, a excepción de la vitamina D, contienen el mismo anillo de ciclopentanofenantreno (esterano), la estructura básica y policíclica del colesterol. El colesterol posee 27 carbonos (C<sub>27</sub>) mientras que las hormonas esteroideas pueden tener 18 (estrano), 19 (androstanos) ó 21 carbonos (pregnanos). Durante la síntesis de las hormonas esteroideas se produce una degradación irreversible del residuo del carbón-6 del colesterol, lo cual deriva en pregnenolona (C<sub>21</sub>) más isocaproaldehído. La pregnenolona es el precursor de las hormonas esteroideas naturales. En cambio, el ácido retinóico y la vitamina D son derivados de la vitamina A y del colesterol, respectivamente. Las hormonas esteroideas más importantes son:

- **Pregnenolona.** La pregnenolona es precursora de todos los esteroides de 18 a 21 carbonos.
- **Progesterona.** La progesterona es una progestina derivada de la pregnenolona y sintetizada en el *corpus luteum*. Es una hormona sexual femenina que modula la fase lútea del ciclo menstrual y la diferenciación de las glándulas mamarias.
- **Testosterona.** La testosterona es una hormona sexual masculina derivada de la progesterona y responsable de las características sexuales secundarias masculinas. Se sintetiza en los testículos.
- **Estradiol.** El estradiol se sintetiza en los ovarios y es la principal hormona sexual femenina, responsable de las características sexuales secundarias femeninas.

- **Aldosterona.** La aldosterona es una hormona derivada de la progesterona y sintetizada en la corteza adrenal. Es un mineralocorticoide que modula la presión sanguínea, el volumen circulatorio, y la concentración de sodio.
- **Cortisol.** El cortisol es un glucocorticoide derivado de la progesterona y sintetizado en la corteza adrenal. Tiene funciones sobre el estrés, la presión arterial, la concentración de sodio, y el sistema inmune.

### 6.3.2. *Biosíntesis de las hormonas esteroideas*

La síntesis de las hormonas esteroideas está mediada por las hormonas peptídicas. La hormona peptídica que estimula dicha síntesis determinará el tipo de hormona esteroide sintetizada, ya que todas provienen de un único precursor, el colesterol:

Hormona Luteinizante (LH) → progesterona y testosterona  
Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) → cortisol  
Hormona Folículo Estimulante (FSH) → estradiol  
Angiotensina II/III → aldosterona

La primera reacción de degradación del colesterol a pregnenolona es clave en la síntesis de las hormonas esteroideas y es una reacción catalizada por la enzima desmolasa o P450<sub>sc</sub>. La desmolasa es un sistema enzimático mitocondrial en el que una enzima de degradación (adrenodoxina) está ligada al citocromo P450 mediante una cadena lateral. Esta primera reacción se ve estimulada por el sistema AMPc/PKA. El AMPc estimula no sólo la PKA, que da lugar a un incremento de la concentración de colesterol, si no además se une a un elemento de regulación (CRE) del gen de la desmolasa y aumenta los niveles de transcripción del ARN (que se traduce en una mayor cantidad de enzima). Además, existe un feedback positivo en la síntesis del colesterol que activa a la HMG CoA reductasa generando más sustrato. Tras su síntesis, la pregnenolona se procesa en el citosol [213].

Toda la síntesis y metabolismo de las hormonas esteroideas está mediada por las hidroxilasas que son un tipo de enzimas de la clase del citocromo P450 (CYPs) [214] y que se encuentran tanto en las glándulas adrenales como en las gónadas.

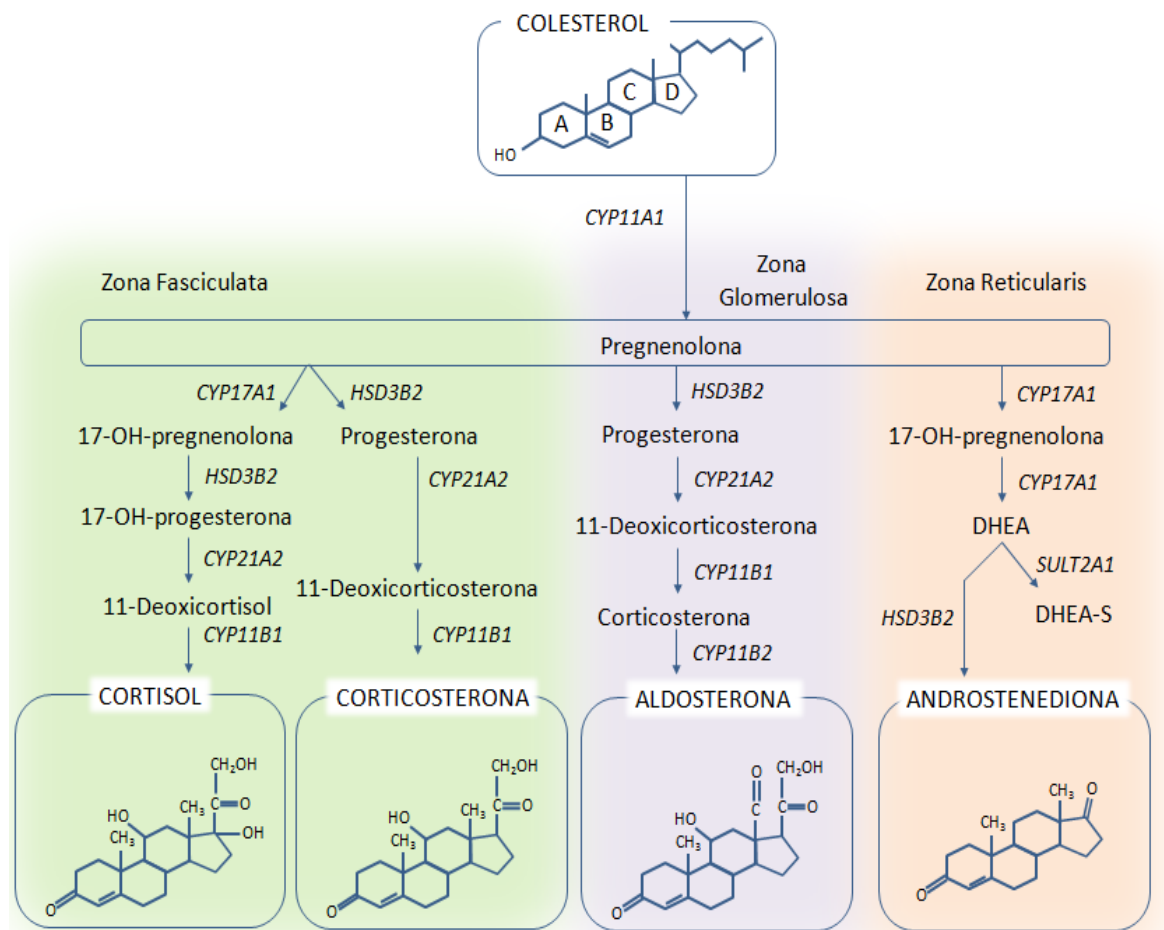
### *Síntesis de las hormonas esteroideas en la corteza adrenal*

En la corteza adrenal se sintetizan los glucocorticoides (regulan el metabolismo de los carbohidratos), los mineralocorticoides (regulan los niveles de sodio y potasio) y los andrógenos. En cada zona de la corteza se sintetiza un grupo diferente de hormonas esteroideas ya que expresan los genes de unas determinadas enzimas del citocromo P450. En la zona glomerulosa o zona externa se sintetizan los mineralocorticoides, en la zona fascicular o zona media los glucocorticoides, y en la zona reticular o zona profunda las hormonas sexuales y algunos glucocorticoides (Figura 8). En las zonas fascicular y reticular la producción hormonal está regulada por la hormona adrenocorticotrópica del hipotálamo (ACTH) que al unirse a sus receptores activa la adenilatociclase que conduce a un incremento en la producción de AMPc. Además, el cortisol generado tiene un feedback positivo sobre los niveles circulantes de la hormona liberadora de corticotropina y ACTH. A diferencia de la síntesis en estas zonas, la síntesis de los mineralocorticoides en la zona glomerulosa está estimulada por las angiotensina II y III. Estas

enzimas interaccionan con un receptor de membrana ligado a una fosfolipasa C que activa a la PKC, la cual a su vez incrementa los niveles de calcio intracelular. En consecuencia, la P450<sub>ssc</sub> se estimula y produce más aldosterona. Por otra parte, el potasio puede además inducir un incremento en la secreción de aldosterona a través de la despolarización de la membrana plasmática y la consecuente apertura de los canales de calcio [215].

En la corteza adrenal se sintetizan mayoritariamente glucocorticoides y sólo se incrementa la producción de otros grupos hormonales en estados patológicos. Por ejemplo, determinados defectos genéticos en los grupos enzimáticos o un tratamiento prolongado con glucocorticoides de la AR pueden conducir a la sobreproducción del andrógeno más importante, la dehidroepiandrosterona o DHEA (síndrome de Cushing yatrogénico).

**Figura 8.** Síntesis de hormonas esteroideas suprarrenales.



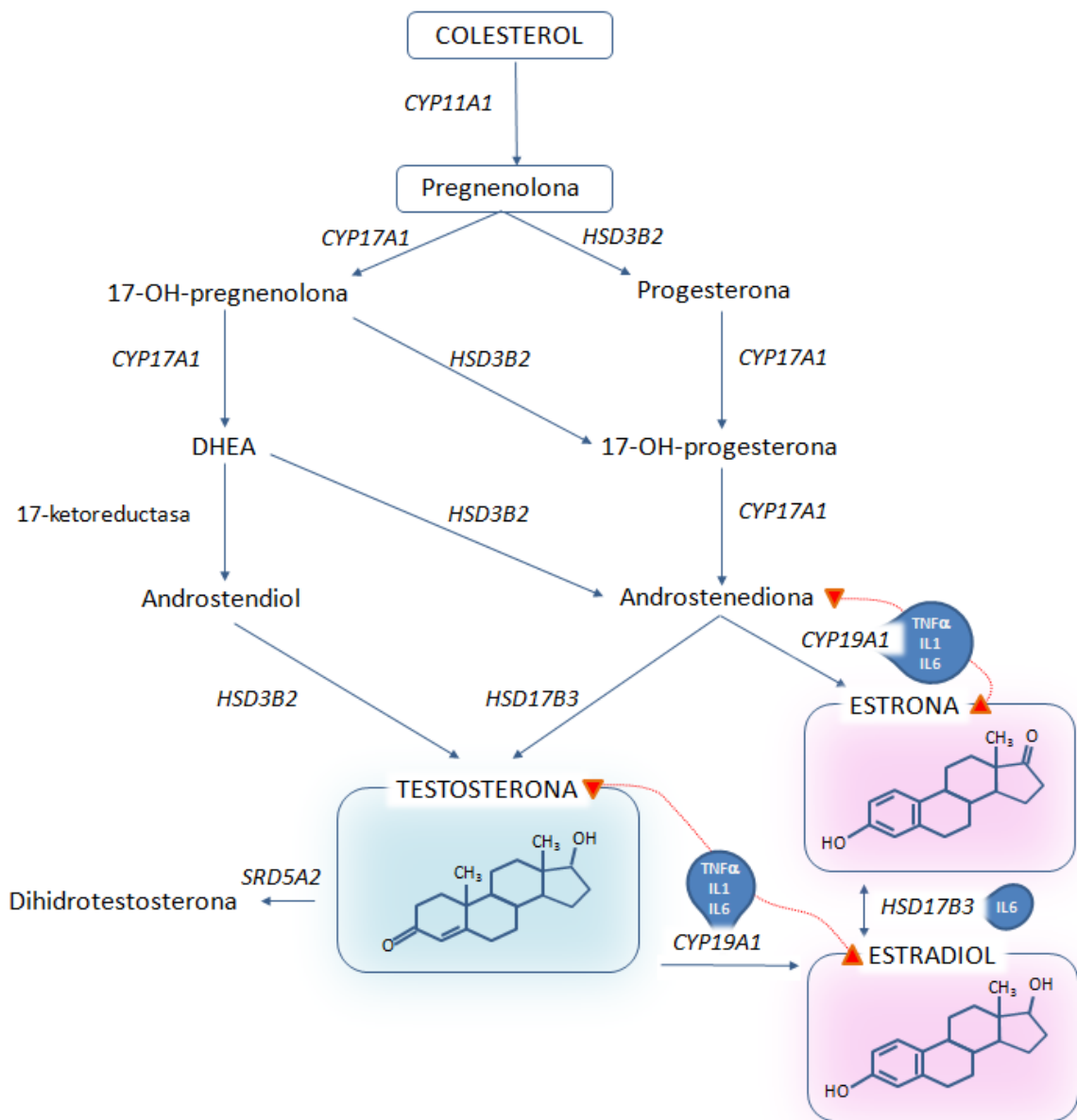
Enzimas. CYP11A1: citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipeptido 1; también denominada P450<sub>ssc</sub>. CYP17A1: citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipeptido 1; también denominada P450C17 o esteroide 17-alfa-monooxigenasa, tiene actividad 17alfa-hidroxilasa, 17,20-liasa y 17,20-desmolasa. HSD3B2: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1; tiene actividad 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y Δ4,5-isomerasa. CYP21A2: citocromo P450, familia 21, subfamilia A, polipeptido 2; también identificado como P450c21; tiene actividad 11β-hidroxilasa. CYP11B1: citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipeptido 1; también denominada P450c11; tiene actividad 11β-hidroxilasa. CYP11B2: aldosterona sintasa, tiene actividad 18α-hidroxilasa, 18-oxocortisol y 11β-hidroxiesteroiliasa. SULT2A1: sulfotransferasa 2A-dehidroepiandrosterona tipo 1.



*Síntesis de las hormonas esteroideas en las gónadas*

En los testículos y los ovarios se sintetizan las hormonas sexuales más importantes: la testosterona y el estradiol (E2), respectivamente (Figura 9). La síntesis de las hormonas sexuales está regulada por la FSH, la LH y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Las hormonas sexuales provocan un feedback positivo en la síntesis de la GnRH. En cambio, bajos niveles de hormonas sexuales inhiben la síntesis de GnRH, lo cual estimula la síntesis de FSH y LH. La enzima P450<sub>ssc</sub> sintetiza las hormonas sexuales tras ser estimulada por las vías del AMPc y la PKA, que son activadas por las hormonas FSH y LH. En este caso la adenilatociclasa requiere la unión simultánea de la LH a sus receptores de membrana. Además, en las gónadas existe una enzima adicional que transforma los andrógenos en testosterona, la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Figura 9) [216].

**Figura 9.** Síntesis de las hormonas sexuales en las gónadas.



Síntesis de las hormonas sexuales masculinas en las células de Leydig del testículo (predomina la síntesis de testosterona, color azul) y de las principales hormonas sexuales femeninas en el ovario (predomina la síntesis de estrona y estradiol, color rosa). Las enzimas *CYP11A1* (P450SSC), *HSD3B2* (3 $\beta$ -DH), y *CYP17A1* (P450c17) son las mismas que las enzimas necesarias para la síntesis de hormonas esteroideas suprarrenales. *CYP19A1*: es una aromatasa, también llamada estrógeno sintetasa. *HSD17B3*: 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3, tiene actividad 17-ketoreductasa. *SRD5A2*: reductasa 5 $\alpha$  tipo 2. Síntesis de las principales hormonas sexuales femeninas en el ovario.

En En los testículos, la LH estimula la síntesis de testosterona en las células de Leydig, desde donde es transportada por una proteína de unión a andrógenos (ABP, *Androgen Binding Protein*) hasta las células de Sertoli. Allí la testosterona es transformada a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) y ambas hormonas son transportadas por el plasma hasta su tejido diana mediante la globulina de unión a esteroides gonadales (GBG, *Corticosteroid Binding Globulin*). La testosterona puede transformarse en 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona que es 10 veces más potente. La FSH es capaz de estimular la producción de testosterona y ABP en las células de Sertoli [216].

En los ovarios, la LH estimula la síntesis de la androstenediona y testosterona por la vía AMPc/PKA en las células tecaes que rodean al folículo. La androstenediona y testosterona son entonces transformadas por la aromatasa (complejo enzimático presente en hombres y mujeres) dando lugar a estrógenos (Figura 9). Por otra parte, la LH es además capaz de estimular la síntesis de andrógenos en las células tecaes que luego son transformados a estrógenos por la aromatasa (estimulada a su vez por la FSH o la LH) en las células de la granulosa. Los estrógenos son finalmente transportados por la misma globulina que la testosterona (GBG) hasta su tejido diana [216].

La enzima aromatasa también ejerce su función en tejidos periféricos. Algunos estudios han demostrado que las citoquinas liberadas durante el proceso inflamatorio en AR (TNF $\alpha$ , IL1, IL6) incrementan la actividad de la aromatasa en el sinovio, acelerando así el metabolismo en pro de la generación de metabolitos de estrógenos proinflamatorios. Como resultado de la actividad de esta enzima en el sinovio, la concentración de estrógenos y andrógenos en el líquido sinovial se ve descompensada y aumentan las cantidades de E2, estrona y otros metabolitos hidroxilados [217] (Figura 9). Además, se produce una retroalimentación positiva ya que los estrógenos del sinovio son capaces de activar a la aromatasa mientras que los andrógenos y la vitamina D la inhiben [218].

#### 6.4. Receptores de las hormonas esteroideas

---

Los receptores de las hormonas esteroideas se localizan en el citosol y en el núcleo celular. Tras su activación son capaces de modular la transcripción de genes diana. Los receptores más importantes son: receptor de andrógenos, receptor de progesterona, receptor de estrógenos, receptor de la hormona tiroidea, receptor de la vitamina D, receptor del ácido retinoico, receptor de mineralocorticoides y receptor de glucocorticoides. La unión al ligando provoca un cambio conformacional de estos receptores que les permite unirse a los elementos de respuesta hormonal que son secuencias específicas del ADN que modulan la transcripción del gen asociado. Existen otros casos concretos con acciones diferentes como el de la hormona tiroidea, en el que la unión al receptor provoca una liberación del receptor del ADN o, la unión de los glucocorticoides a su receptor viene seguida de una translocación del complejo ligando-receptor del citosol al núcleo [216].

## 6.5.El papel de las hormonas esteroideas en la AR

---

### 6.5.1. *Las hormonas esteroideas sexuales en la AR*

En la AR, las mujeres suelen presentar una mayor prevalencia, mayor severidad y manifestaciones clínicas más severas en comparación con los hombres. Esta diferencia entre sexos sugiere que las hormonas esteroideas sexuales desempeñan un papel en el control de la respuesta inmune [206]. La testosterona y los estrógenos (estradiol y sus receptores) son las principales hormonas sexuales que intervienen en la respuesta inmune [208, 211]. En la AR la testosterona actúa principalmente como un factor anti-inflamatorio mientras que el papel que desempeñan los estrógenos está menos claro. Aunque los estudios sobre el papel de los estrógenos son contradictorios, con resultados *in vitro* que difieren de los resultados *in vivo*, los estrógenos parecen promover mayoritariamente una respuesta inmune inflamatoria.

Los estudios *in vitro* indican que la testosterona y los estrógenos pueden tener funciones opuestas en la AR. En los hombres, la testosterona ayuda a prevenir la respuesta autoinmune ya que induce un incremento de las células Th2 y de la secreción de IL10 y, además, induce una disminución de la diferenciación de las células B, la producción de autoanticuerpos y la proliferación de los fibroblastos [211, 219]. Además, la testosterona puede inhibir la activación de la respuesta inmune mediada por las células Th1 al bloquear las vías PTPN1-STAT4 e IL12R [220]. Sin embargo, los estrógenos por el contrario incrementan la proliferación de los fibroblastos [219] e incrementan la producción de Interferón gamma tipos I y II, con los que interaccionan para desencadenar una retroalimentación positiva que regula la inmunidad innata [208]. Además, los estrógenos activan el inflammasoma y estimulan la síntesis de citoquinas proinflamatorias [209, 210] y pueden incluso incrementar la expresión de los receptores de la progesterona (PGR) y potenciar los efectos de la misma sobre la respuesta inmune [221].

La progesterona es un precursor de las hormonas esteroideas que es capaz de modular el equilibrio entre la respuesta inmune mediada por las células Th1 y Th2 y, por tanto, puede constituir un mecanismo de regulación intrínseca de la acción de las hormonas sexuales en relación a la respuesta inmune. La progesterona y los estrógenos tienen efectos opuestos sobre la respuesta inmune Th1, la activación de las células dendríticas y la diferenciación de los linfocitos B [212]. Los efectos más destacables de la progesterona son el incremento de la secreción de IL4 y la disminución de IFN $\gamma$ , IL6 y TNF $\alpha$ . La progesterona no sólo puede actuar a través de sus propios receptores sino que a altas dosis fisiológicas también es capaz de activar a los receptores de los glucocorticoides. Los efectos de esta hormona dependen de la concentración a la que se encuentre y del lugar de acción. Por ejemplo, durante la gestación, cuando los niveles de progesterona son altos, se observa una disminución de la severidad de la AR asociada a un incremento de la respuesta inmune vía Th2 y una inhibición de las vías Th1 y Th17 [212]. A pesar de la importancia de estos datos, aun son escasos los estudios que han evaluado el impacto de esta hormona en la etiopatogénesis de la AR.

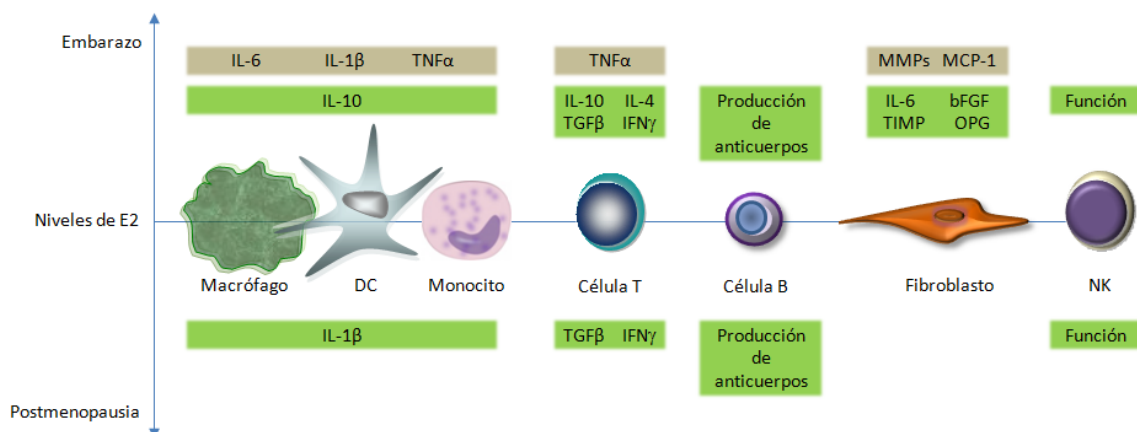
En el ámbito de los mecanismos patogénicos de la AR, los estrógenos son las hormonas sexuales más estudiadas por su papel en la inflamación y en la destrucción tisular. Los niveles de las hormonas sexuales en el organismo difieren entre sexos y de acuerdo al estado fisiológico del individuo y, además, pueden variar durante las distintas etapas de la AR. Las principales citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  e IL1) incrementan la ratio de estrógenos frente a andrógenos en el líquido sinovial y, también, influyen sobre el metabolismo de los estrógenos

incrementando la conversión de los precursores metabólicos a la forma hormonal activa [222]. El desbalance entre andrógenos y estrógenos presente en el sinovio inflamado también provoca una mayor actividad de la enzima aromatasa, la cual a su vez produce un aumento de los metabolitos de estrógenos proinflamatorios (16-OH estrógenos) [218].

### Receptores y vías de acción de los estrógenos

El efecto de los estrógenos está mediado por sus receptores intracelulares que actúan a nivel genómico. Los receptores de estrógenos (RE) provocan modificaciones epigenéticas de la cromatina y regulan la transcripción de los genes diana a través de sitios de unión específicos [223]. Los REs se expresan de forma ubicua en las células del sistema inmune y regulan la población de progenitores hematopoyéticos y, por tanto, la maduración de las células inmunes [208]. Hay dos tipos de receptores de estrógenos, el receptor alfa (ER $\alpha$  o ESR1) y el beta (ER $\beta$  o ESR2) y cada uno de ellos presenta varias isoformas. Aunque ambos tipos de receptores están presentes en las células del sinovio, en los pacientes de AR se ha demostrado que existe una mayor expresión de ESR2 en fibroblastos, en las células inmunes y en la membrana sinovial inducida por el estrés oxidativo. Por el contrario, la expresión de ESR1 está disminuida por la hipoxia y las condiciones derivadas de la inflamación. Además, ESR2 puede jugar un papel en la cronicidad de la enfermedad ya que es capaz de inhibir la secreción de IL1 a través de la inhibición de ESR1 [224].

**Figura 10.** Efectos de los distintos niveles del estradiol (E2) en la respuesta inmune.



El eje Y representa los niveles de E2: alto en el embarazo y bajo en la menopausia. El color verde indica estimulación y el color gris inhibición. Abreviaturas: IL, interleuquina; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; TGF $\beta$ , factor de crecimiento transformante beta; IFN $\gamma$ , interferon gamma; MMPs, metaloproteinasas; MCP1, ligando tipo 2 de la quimioquina (motivo C-C); bFGF, factor de crecimiento básico de los fibroblastos; TIMP, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; OPG, osteoprotegerina; célula dendrítica, célula dendrítica; NK, célula *natural killer*. Basado en *Straub RH, Endocr Rev 2007 [224]*.

Los receptores de estrógenos pueden ejercer su función por dos vías:

- Vía clásica. Requiere una interacción directa entre los estrógenos y sus receptores en la membrana nuclear. Una vez activados los REs modulan la transcripción de los genes diana y remodelan la cromatina para que el ADN sea más accesible a los factores de transcripción. Existen dos maneras de unión del complejo ligando-RE al ADN en el gen diana. Una primera opción es a través de un enlace directo a un sitio de unión específico para los REs (elemento de respuesta a los estrógenos, ERE) y la segunda opción consiste en la formación de un complejo con otros factores de transcripción que poseen su sitio de unión específico

al ADN, como por ejemplo NFκB, AP1 o SP1 (todos ellos involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata). Los receptores ESR1 y ESR2 presentan una alta homología en el dominio de unión al ADN y un patrón similar para la activación de la transcripción a través de los EREs. Los REs además pueden atraer co-activadores (por ejemplo, el coactivador 1 del receptor de esteroides o SRC1) o co-represores (por ejemplo, el co-represor del receptor nuclear 1 ó NCOR) que remodelan a la cromatina para modular la transcripción mediante la conformación del ADN [223].

- Vía no clásica. Consiste en una señal de transducción no nuclear también denominada señalización esteroide iniciada en la membrana (MISS) a través de la cual los estrógenos pueden ejercer su acción de forma muy rápida. Requiere de la activación de los ERα. Los efectos no genómicos más importantes de la MISS son la movilización del calcio intracelular, la modulación del potasio, la activación de la fosfolipasa C, la producción de óxido nítrico y de AMPc y la estimulación de la vía de las kinasas (PI3K/AKT y MAPK1). Los efectos de la MISS pueden desencadenar la actividad transcripcional de ESR1 y, además, pueden provocar modificaciones en las histonas y la cromatina que regulan la transcripción génica [208]. Esta vía no clásica puede ser inhibida por ESR2 a través del factor de transcripción AP1. Se ha sugerido que ESR2 es el responsable de un incremento de los eventos apoptóticos y los mecanismos antiproliferativos a través de vías genómicas y no genómicas [225].

### *Condicionantes de los efectos de los estrógenos*

El efecto de los estrógenos en la AR no sólo depende de la vía de acción y del receptor al que se unen sino que además parece depender de otra serie de factores [224]:

- Del estímulo inmune y, consecuentemente, del tipo de respuesta inmune generada.
- De los tipos celulares que intervienen en las distintas fases de la enfermedad. Un ejemplo de esto lo podrían constituir las células B que pueden ser activadas por los estrógenos independientemente del estado fisiológico en que se encuentre el paciente.
- Del microambiente en el órgano donde se provoca el daño tisular.
- De los niveles de estrógenos durante la evolución de la enfermedad. Según se ha descrito, los diferentes niveles de estrógenos podrían determinar un efecto pro- o anti-inflamatorio [224]. Los niveles de estrógenos dependen del sexo, del estado fisiológico del paciente y de la posible administración exógena. Por ejemplo, durante la etapa fértil existe una mayor concentración de hormonas esteroideas que induce una respuesta inmune mediada por las células B, mientras que cuando existen niveles bajos de testosterona y de estrógenos, predomina la respuesta inmune mediada por las células T y los macrófagos. Además, una estimulación estrogénica induce una respuesta inmune mediada por las células Th2, mientras que la androgénica estimula la vía Th1 (células T CD8+) e inhiben la vía Th2. Durante el embarazo además se incrementan los niveles de E2 y progesterona que favorecen una respuesta inmune vía Th2 [226] e inhiben la respuesta inmune mediada por el TNFα. Durante la menopausia ocurre lo contrario. Otro ejemplo lo constituye la estimulación dosis-dependiente de la vía NFκB provocada por el E2 [227]. Algunos estudios en animales demuestran que altos niveles de estrógenos promueven una respuesta inmune anti-inflamatoria y/o disminuyen la respuesta inmune proinflamatoria [228, 229]. En cuanto al sexo, en las mujeres los REs pueden contribuir a la autoinmunidad al acelerar la inflamación derivada del ciclo celular de las células madres hematopoyéticas (Figura 10) [208].

- De los niveles de expresión de los receptores de estrógenos (ESR1 y ESR2) y del tipo del receptor al que se unan los estrógenos [226]. El ESR1 es la forma más activa y se expresa más durante la inflamación. Fisiológicamente existen distintos niveles de expresión de los receptores de estrógenos o diferencias en la concentración del ligando entre sexos, lo cual puede provocar diferencias en la señalización [230]. Ya que el ESR1 puede inhibir la vía clásica de los receptores de estrógenos y la vía del NFκB (activada por la vía clásica) su nivel de expresión o el de sus ligandos puede afectar a la respuesta inmune innata [208].
- Del metabolismo intracelular de los estrógenos y de los metabolitos que genera. Sabemos que durante la AR las células implicadas en la inflamación generan 2- y 4-hidroxiestrógenos mientras que las células sanas generan más 16- $\alpha$ -hidroxiestronea y 16- $\alpha$ -hidroxiestradiol [231]. Los metabolitos 2-metoxiestradiol (2-MeOH), 2- y 4-hidroxiestrogenos inhiben la secreción de TNF $\alpha$  mientras que, en modelos animales, el 2-MeOH es capaz de suprimir una artritis inducida por el colágeno tipo II [218].

### *Efectos de los estrógenos en los distintos tipos celulares*

Uno de los factores que influyen en los efectos de los estrógenos sobre la respuesta inmune inflamatoria es el tipo celular donde ejercen su acción. Los principales efectos de los estrógenos en las distintas células inmunes que participan en la AR son:

**Macrófagos.** Múltiples estudios muestran que el ESR1 estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL4, IL6, IL10) en respuesta a la estimulación de los TLRs en los macrófagos [226]. Tras la estimulación de la vía del TLR4, el estradiol puede reducir la inhibición de la vía del *PI3K* y la fosforilación de *AKT*, lo cual resulta en una mayor producción de IL6, IL1 $\beta$  e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible)[208]. Sin embargo, durante el embarazo los estrógenos inhiben la secreción de TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  y ROS, reduciendo la actividad inflamatoria de los macrófagos en los pacientes con AR (Figura 11)[232].

**Células dendríticas.** Las células dendríticas son uno de los tipos celulares con mayor expresión de ESR2 y, en general, los niveles de expresión de los distintos REs parecen no diferir entre sexos [208]. La señalización de los REs afecta a la maduración de la célula dendrítica en el proceso de la diferenciación ya que induce cambios epigenéticos en los precursores que afectan a la respuesta funcional de la célula dendrítica madura [233]. Durante la maduración, los REs regulan la expresión génica y tras su activación a través de E2 (entre otros ligandos) incrementan la capacidad funcional de la célula diferenciada. Además, el E2 y el ESR1 activan la diferenciación de las células dendríticas que viene mediada por el factor de regulación del interferón tipo 4 (IRF4) y GM-CSF [234]. Los estrógenos paralizan el reclutamiento de las células presentadoras de antígeno, inhiben su interacción con las células T y suprimen la secreción de citoquinas proinflamatorias [235]. Un ejemplo de cómo afectan los estrógenos a la interacción con las células T es la inducción mediada por el E2 de la expresión del TLR8 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El E2 también es capaz de estimular la producción de IFN $\alpha$  a través de las vías de TLR7 y TLR9 en las células dendríticas plasmacitoides [236]. Por otro lado, en respuesta a la estimulación de los TLRs, el E2 a través de ESR1 puede estimular a la célula dendrítica a producir citoquinas proinflamatorias como IL6, IL23, IL12 e IL1 $\beta$  [208]. Además, el E2 induce la expresión del CD40 en las células dendríticas por la vía del p38 y las MAPKs [217] y, en el contexto del embarazo durante la AR, puede inhibir la secreción de TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$  y ROS reduciendo así el potencial inflamatorio (Figuras 10 y 11)[232].

**Células T.** Los niveles de expresión de los ERs parece no diferir en este tipo celular según el sexo o el estado fisiológico del paciente [208]. Los estrógenos inhiben la maduración de las células Th1 y Th17 y, por tanto, la respuesta inmune mediada por estas células. Además, al contrario que ocurre con los andrógenos, los estrógenos son capaces de estimular a las células Treg incrementando la producción de citoquinas anti-inflamatorias y promoviendo la vía mediada por las células Th2. En concreto, los estrógenos estimulan la producción de IL4, IL5, IL6 e IL10 por las células Th2. Estos efectos anti-inflamatorios son más evidentes en estados fisiológicos como el embarazo [232]. En contraposición, se ha observado que altos niveles de estrógenos aceleran la maduración de las células T e inhiben la apoptosis a través de la inducción de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL2 y la inhibición de la expresión de FasL [217, 226]. Asimismo, niveles elevados de estrógenos promueven la respuesta inflamatoria Th1, estimulan la maduración de las células T y la secreción de IFN $\gamma$  [232]. En un reciente estudio, Andersson *et al.* (2015) demostraron que la administración de E2 en etapas iniciales de la enfermedad provocaba un incremento de las células Th17 en los nódulos linfáticos pero que dicho efecto se revertía en etapas más avanzadas donde ya existía una AR establecida. Estos datos sugerían que el E2 podría ejercer su acción sobre las células Th17 a través del control la vía CCR6-CCL20 (Figura 11)[237].

**Células NK.** Tanto los estrógenos como la progesterona poseen un efecto supresor de la actividad citotóxica de estas células (Figura 11)[226].

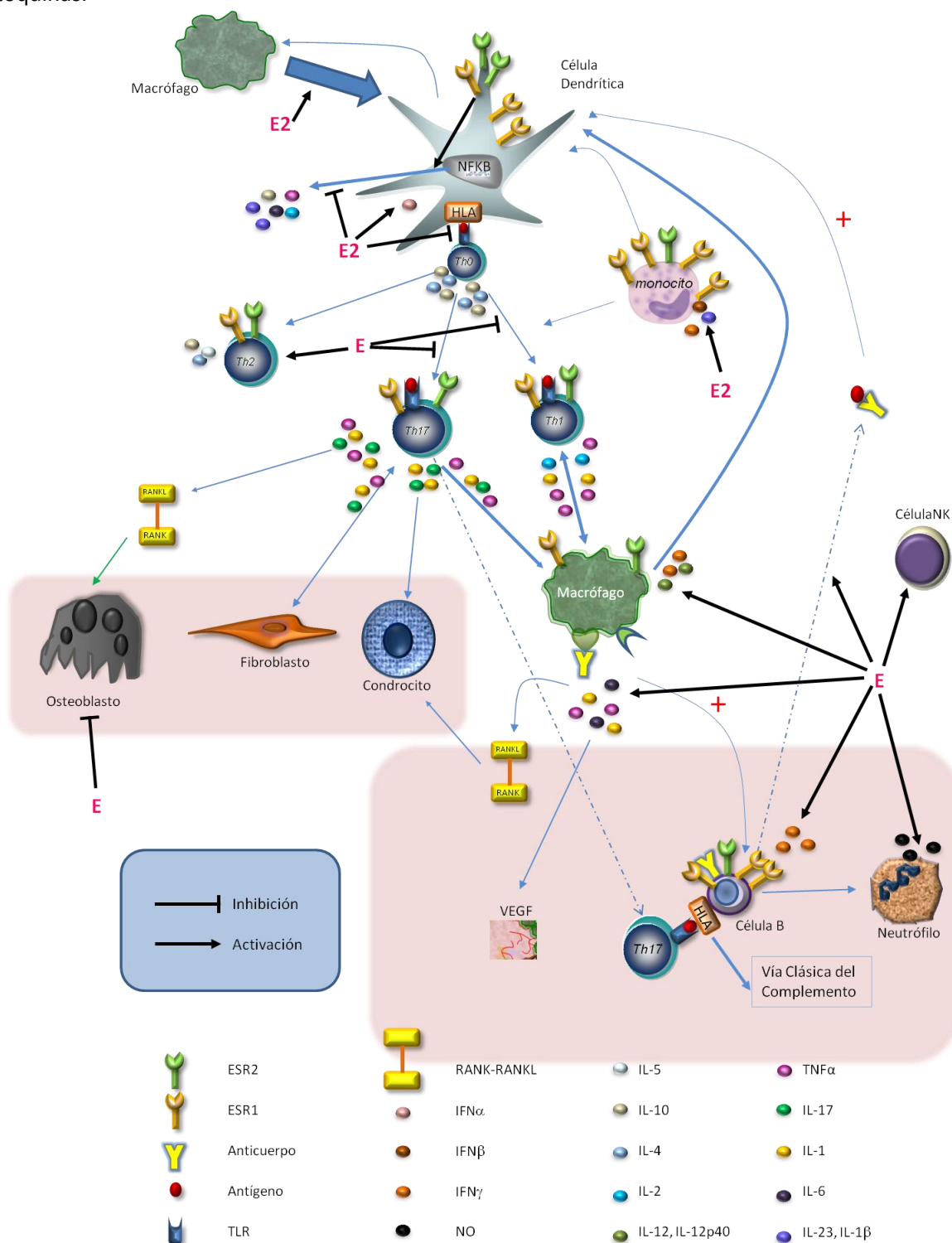
**Células B.** Las células B expresan todos los tipos de receptores de estrógenos, y la expresión de los mismos está autorregulada. Los linfocitos B son las células inmunes que mayores niveles de ESR1 y ESR2 expresan y aunque su expresión no parece depender del sexo o del estado fisiológico [208], algunos autores ha sugerido que su expresión es mayor en mujeres que en hombres [238]. Los estrógenos autoregulan a las células B a través del control de la actividad transcripcional de genes como *BCL2*, *IRF5* y *AICD* y pueden, además, afectar a la función de otros tipos celulares como las células estromales [239]. Los estrógenos, a través de ESR1 y ESR2, suprimen la linfopoyesis de las células B en la médula ósea, incrementan la hipermutación somática y activan la vía clásica de recombinación en las células B maduras, mientras que disminuyen la apoptosis y eliminan la autorreactividad de las células B inmaduras [240]. Fuera de la médula ósea, los estrógenos incrementan la supervivencia de las células B, activan su proliferación y los clones autorreactivos [217]. Además, son capaces de estimular la producción de autoanticuerpos con IgG e IgM [226, 232] y potencian la respuesta inmune mediada por el IFN $\gamma$  (Figura 11)[209].

**Neutrófilos.** Los estrógenos y la progesterona inhiben la apoptosis de los neutrofilos. Además, los estrógenos, al contrario que la progesterona, estimulan la producción de óxido nítrico y disminuyen su capacidad quimotáctica (Figura 11) [226].

**Monocitos.** Los monocitos son las células inmunes que menores niveles de ESR1 expresan y, al contrario que los tipos celulares mencionados anteriormente, su expresión puede variar dependiendo del sexo del individuo y de su estado fisiológico [241]. TRIM-21 también es inducida por E2-ESR1 en monocitos y esto conduce a un aumento de la estabilidad de IRF3 y la producción de IFN $\beta$  y IL-23 [242]. Además, un reciente estudio ha demostrado que el estradiol induce la vía del IFN $\gamma$  tipo I en los monocitos derivados de los macrófagos [208] y que la presencia tanto de estrógenos como de progesterona disminuyen el número de monocitos (Figura 11) [226].

**Osteoclastos.** Los estrógenos son capaces de inhibir la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos y de incrementar los eventos anti-apoptóticos a nivel tisular [243].

**Figura 11.** Efectos de los estrógenos (E) y el E2 sobre las células inmunes y la secreción de citoquinas.



Los cambios hormonales que se producen durante el embarazo o en otras condiciones fisiológicas pueden generar efectos distintos a los representados en esta figura.



Condrocitos. El E2 inhibe la expresión de MMP-13 en los condrocitos a través de su RE y miR-140, vía a través de la cual el E2 ejerce una acción bloqueante de la degradación de la matriz del cartílago inducida por IL1 $\beta$  [195].

### *Receptores de la progesterona*

El receptor de la progesterona (RP o PGR, del inglés *progesterone receptor*) está codificado por un único gen (*PGR*) situado en el cromosoma 11q22 que también es conocido como *NR3C3* (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 3). El PGR se puede expresar de manera intracelular (iPR) o en la membrana celular (mPR) y tiene dos isoformas principales que difieren en su peso molecular: A y B (ó  $\alpha$  y  $\beta$ ). Estas isoformas se diferencian en 165 aminoácidos del dominio regulador N-terminal del RP-B y que dotan a dicho receptor de una función activadora de la transcripción (TAF) especial, llamada TAF-3, de la cual carece el RP-A. El PGR posee un dominio de unión al ADN y modula la transcripción genética. El RP-A y RP-B son dos factores de transcripción funcionalmente distintos, que median sus propios genes de respuesta y provocan diferentes efectos fisiológicos. El RP-B promueve la proliferación de células epiteliales tras un estímulo por estrógenos o estrógenos y progesterona conjuntamente, mientras que el RP-A inhibe la proliferación RP-B-dependiente o la inducida por estrógenos [244].

Se ha demostrado que los PGRs se expresan en células inmunes implicadas tanto en la respuesta inmune adaptativa como en la innata. En concreto, estos receptores se expresan en mastocitos, células NK, macrófagos, pCDs y células T CD4+ y CD8+. La progesterona no sólo es capaz de activar a los iPR y mPR, sino que también provoca efectos no transcripcionales a través de componentes asociados a su mPR (PRMC, por sus siglas en inglés: *progesterone receptor membrane component*) o a través de su interacción con los canales iónicos de membrana que altera determinadas funciones celulares [212]. Además, cuando existen altas concentraciones de progesterona, como ocurre durante el embarazo, esta hormona puede activar también a los receptores de los glucocorticoides. Al igual que ocurre con los estrógenos, los efectos de la progesterona dependerán de factores como la concentración de la hormona, el tipo de receptor, el tipo de ligando, el tipo de célula, etc. Por ejemplo, el mPR $\alpha$  (receptor tipo A de membrana) estimula a los linfocitos T CD8+ durante la fase lutea en las mujeres, mientras que en el resto del ciclo ovárico prevalece la respuesta CD4+ [221].

### *Efectos de la progesterona sobre los componentes celulares del sistema inmune*

Aunque aun existe una gran falta de conocimiento sobre las acciones concretas que ejercen la progesterona y sus receptores sobre la respuesta inmune, algunos autores han sugerido que estas hormonas son capaces de modular la inmunidad. Ciertos datos sugieren que durante el embarazo los niveles de progesterona y estrógenos aumentan significativamente al igual que la actividad inmune del complemento, lo que sugiere que pueda existir una correlación entre ambos fenómenos. Los efectos de la progesterona varían dependiendo del tipo celular [212, 232]:

Neutrófilos. La progesterona inhibe la liberación del anión superóxido y la apoptosis de este tipo celular. Además, antagoniza la quimiotaxis estimulada por los estrógenos. Estos efectos correlacionan con la capacidad de esta hormona para detener la destrucción tisular en enfermedades autoinmunes como la AR[212].

Eosinófilos, mastocitos y basófilos. La progesterona combinada con los estrógenos estimula la desgranulación de los eosinófilos, aunque en modelos animales la progesterona provoca este

mismo efecto sin combinar. La progesterona puede estimular la quimiotaxis de los mastocitos y la acción de los basófilos en la respuesta Th2 [212].

**Células NK.** Estudios *in vitro* han demostrado que la progesterona puede inhibir las funciones de las células NK de forma tanto directa como indirecta. Así, la progesterona induce directamente la apoptosis de las células NK e inhibe la secreción de INF $\gamma$  a través de los iPRs [212, 245].

**Macrófagos.** Los estudios *in vitro* demuestran que la progesterona inhibe las funciones de los macrófagos y la secreción de TNF $\alpha$  [246]. Aunque algunos estudios en animales sugieren efectos contrarios entre la progesterona y los estrógenos en los macrófagos (como es la inhibición de la expresión de Fc $\gamma$ R mediante los iPR [212]), estudios en pacientes durante la fase del embarazo sugieren que la progesterona actúa conjuntamente con los estrógenos y el cortisol para suprimir la activación de los macrófagos y así disminuir la actividad de la AR [232].

**Células dendríticas mieloides.** A través de los iPRs, la progesterona a altas concentraciones inhibe la estimulación del TLR, la expresión de CD80, CD86 y MHC-II, y la secreción de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12p40 e IL10 [212, 247, 248]. Altos niveles de progesterona incitan la presentación de antígeno a las células T CD4+ favoreciendo la respuesta inmune mediada por las células Treg y Th2, y restringiendo a las células Th1. Los estudios realizados hasta la fecha en modelos murinos con derivados sintéticos de la progesterona muestran diferentes efectos de esta hormona sobre la presentación de antígeno, la diferenciación de las células T CD4+ y la respuesta inmune adaptativa en función del tipo de receptor estimulado (mPR, iPR, GR [212, 249]). No obstante, los resultados son inconcluyentes y requieren nuevas investigaciones que esclarezcan el papel de esta hormona y sus receptores.

**Células dendríticas plasmacitoides.** La presencia de virus hace que las células dendríticas plasmacitoides secreten IFN $\alpha$  ante un estímulo de los TLR7, TLR8 y TLR9. Algunos estudios han correlacionado los niveles de progesterona en la sangre de mujeres y enfermos de VIH con los niveles de IFN $\alpha$  secretado por las células dendríticas plasmacitoides tras un estímulo de los TLR7 y TLR8 [212, 250]. Además, algunos investigadores han mostrado una asociación entre los niveles de expresión de mPR $\alpha$  e IFN $\alpha$  en el género femenino, lo que, sumado al incremento del IFN $\alpha$  secretado por las células dendríticas plasmacitoides cuando éstas se exponen a altas concentraciones de IFN $\alpha$ , podría explicar, al menos en parte, las diferencias de prevalencia dependientes de género en enfermedades autoinmunes como la AR. Dado el papel de esta hormona, incluso se está estudiando cómo los anticonceptivos (progestágenos sintéticos que actúan a través de GR) podrían ayudar en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes al inhibir la secreción de IFN $\alpha$  por la vía del TLR9 en este tipo celular [212, 250].

**Células T CD4+.** Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la progesterona a través de iPRs es capaz de inhibir la proliferación de las células CD4+ y la diferenciación de las células Th1 y Th17, así como estimular la maduración de las células Treg y Th2. De este modo, la progesterona promueve un incremento de la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias en detrimento de aquellas pro-inflamatorias. De hecho, algunos investigadores han relacionado las altas concentraciones de esta hormona con un incremento de la secreción de IL4 e IL10 por las células Th2. Así pues, la progesterona podría desempeñar un papel importante en la remisión de la AR durante el embarazo [212, 232].

**Células CD8+.** La progesterona actúa conjuntamente con los estrógenos para disminuir la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+. En este sentido, la progesterona ejerce sus efectos directamente a través de los mPR $\alpha$  [251].

Células B. Algunos estudios sugieren que la progesterona puede suprimir la diferenciación de las células B a través de los iPRs, modulando la acción autoinmune de estas células en enfermedades como la AR [252, 253]. Además, la progesterona puede provocar una modificación post-translacional de los anticuerpos generados por los linfocitos B, lo cual alterará la acción inmune de los mismos disminuyendo su capacidad para unirse y activar al complemento o a los FcR de las células inmunes [254]. Existen evidencias de que la progesterona y los estrógenos ejercen acciones contrarias sobre la producción de autoanticuerpos mediante sus efectos en el desarrollo, selección, supervivencia y diferenciación de las células B [212, 232].

## 7. Genética de la AR

---

Numerosas investigaciones han demostrado la influencia de la genética de cada individuo en el riesgo a desarrollar AR. MacGregor y colaboradores investigaron la heredabilidad en la AR y demostraron que el 60% de la variabilidad fenotípica se debía a la genética, dejando el resto a factores ambientales y otros procesos estocásticos (variables aleatorias que varían en el tiempo) [255]. Hoy sabemos que, en gran medida, el desarrollo de la enfermedad se debe a la interacción entre factores genéticos y ambientales. Entre las regiones del genoma más fuertemente asociadas a la susceptibilidad de la AR destacan la región del *HLA*, *PTPN22*, *CTLA4*, *PADI4*, *TNF $\alpha$ IP3* o *STAT4* [256-262] y entre los factores ambientales más destacados encontramos las infecciones previas o el tabaquismo.

### 7.1. Evolución de la genética de la AR

---

En 1974 se empezó a vislumbrar el papel central que los genes en la región *HLA* tienen en la susceptibilidad a AR con la identificación del alelo *HLA-DRw4*. Éste fue uno de los principales descubrimientos que luego dieron lugar a la teoría del “epítipo compartido” que establece que una determinada secuencia de aminoácidos (QRRAA en las posiciones 70-74) en la cadena *DRB1*, compartida por los antígenos DR1, está asociada con la susceptibilidad a desarrollar AR y además con su severidad y progresión [263-267]. La región *HLA-DRB1* representa el mayor factor de riesgo genético para el desarrollo de AR.

Durante mucho tiempo la mayoría de las investigaciones genéticas que se han llevado a cabo en el ámbito de la AR han sido desarrolladas en el contexto de estudios de genes candidato que han permitido identificar numerosos *loci* asociados a esta enfermedad (*HLA*, *PTPN22*, o *STAT4*). Los estudios de genes candidato de base poblacional han demostrado que los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) pueden jugar un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad [268, 269]. Recientemente, los estudios denominados GWAS han permitido analizar regiones más extensas del genoma humano [68, 262] y han permitido la identificación de nuevos genes o regiones de susceptibilidad como son: 22q12, *TNFSF4*, *IRAK1*, *REL*, *CD28*, *TYK2*, *LBH*, *EOMES*, *ETS1-FLI1*, *COG6*, *RAD51B*, *UBASH3A*, *SYNGR1* y *TNF $\alpha$ IP3* [68, 270, 271]. Estos estudios o incluso los posteriores meta-análisis han confirmado algunas de las asociaciones previamente descritas (*HLA* o el *PTPN22*), y además, han ayudado a conocer más de un centenar de loci asociados al riesgo de esta enfermedad en la última década [262, 272].

La mayoría de los SNPs descritos por los GWAS en AR se encuentran en regiones no codificantes. Si consideramos las regiones no-*HLA*, sólo un 10% de las variantes descritas codifican para un cambio de aminoácido. A pesar de lo curioso de estos datos, es importante destacar que la mayoría de los SNPs son funcionales, es decir, poseen una función específica que puede afectar a la expresión génica, al “splicing”, la función de miRNAs y la metilación entre otros procesos

biológicos. Recientes estudios epigenéticos demuestran que la mayoría de las variantes descubiertas con los GWAS tienen funciones reguladoras [273] pudiendo afectar a subtipos celulares específicos y a extensas regiones reguladoras del genoma conocidas como potenciadores o superenhancers. Así, los estudios que han evaluado la funcionalidad de estas variantes demuestran que un 60% de las variantes causales descritas por los GWAS pueden actuar como *enhancers* o provocar modificaciones de las histonas afectando a la transcripción del ARNm [270]. Los investigadores intentan encontrar cuál es el posible efecto de los hallazgos genéticos para así poder buscar explicaciones plausibles a los efectos genéticos observados. Así, por ejemplo, Farh y colaboradores desarrollaron un algoritmo (PICS) que permitía predecir la probabilidad de que un polimorfismo fuera una variante causal en una enfermedad autoinmune. Para ello, se basaron en los GWAS previamente publicados y sus resultados mostraron que un 90% de los PICS SNPs (SNP con alta probabilidad de ser una variante causal) se localizan fuera de regiones codificantes y el 60% eran potenciales *enhancers* (Figura 12) [270, 274]. Aunque Farh y colaboradores demostraron que estas variantes suelen ubicarse cerca de regiones reguladoras de la diferenciación inmune y que alteran la expresión génica tras un estímulo previo, sólo pudieron demostrar que un 10-20% de ellas afecta a los factores de transcripción. Aún desconocemos en gran medida el mecanismo de acción de la mayoría de las variantes causales no codificantes que se han identificado en la AR [274].

**Figura 12.** Representación gráfica de la localización de los posibles SNPs causales en AR.

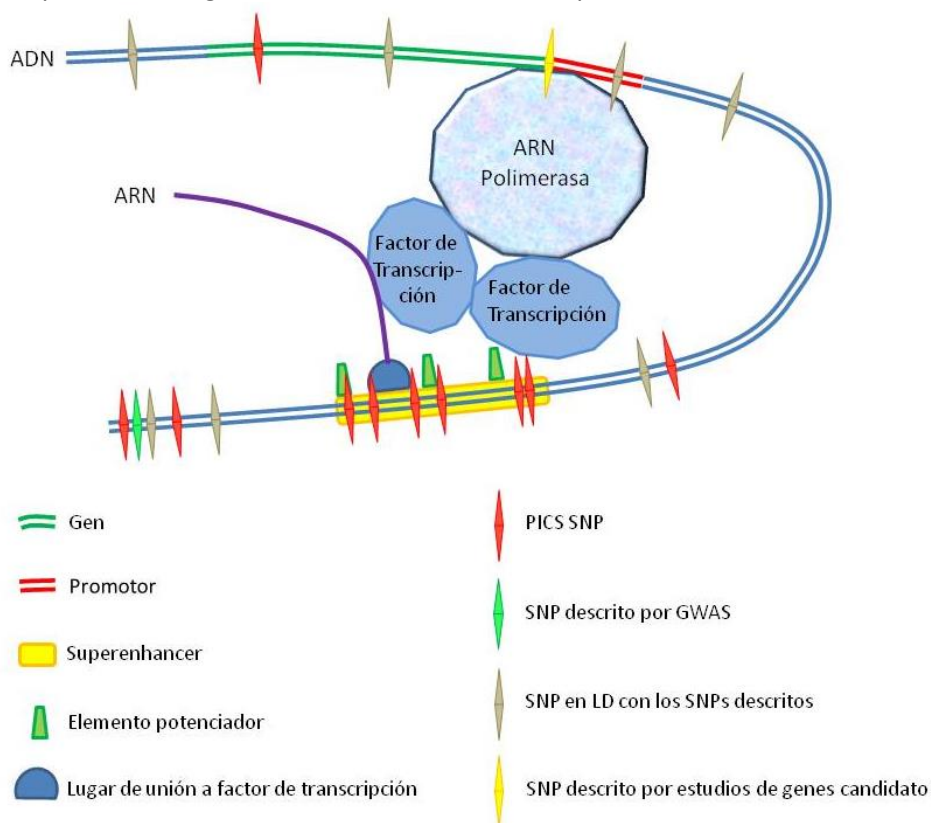
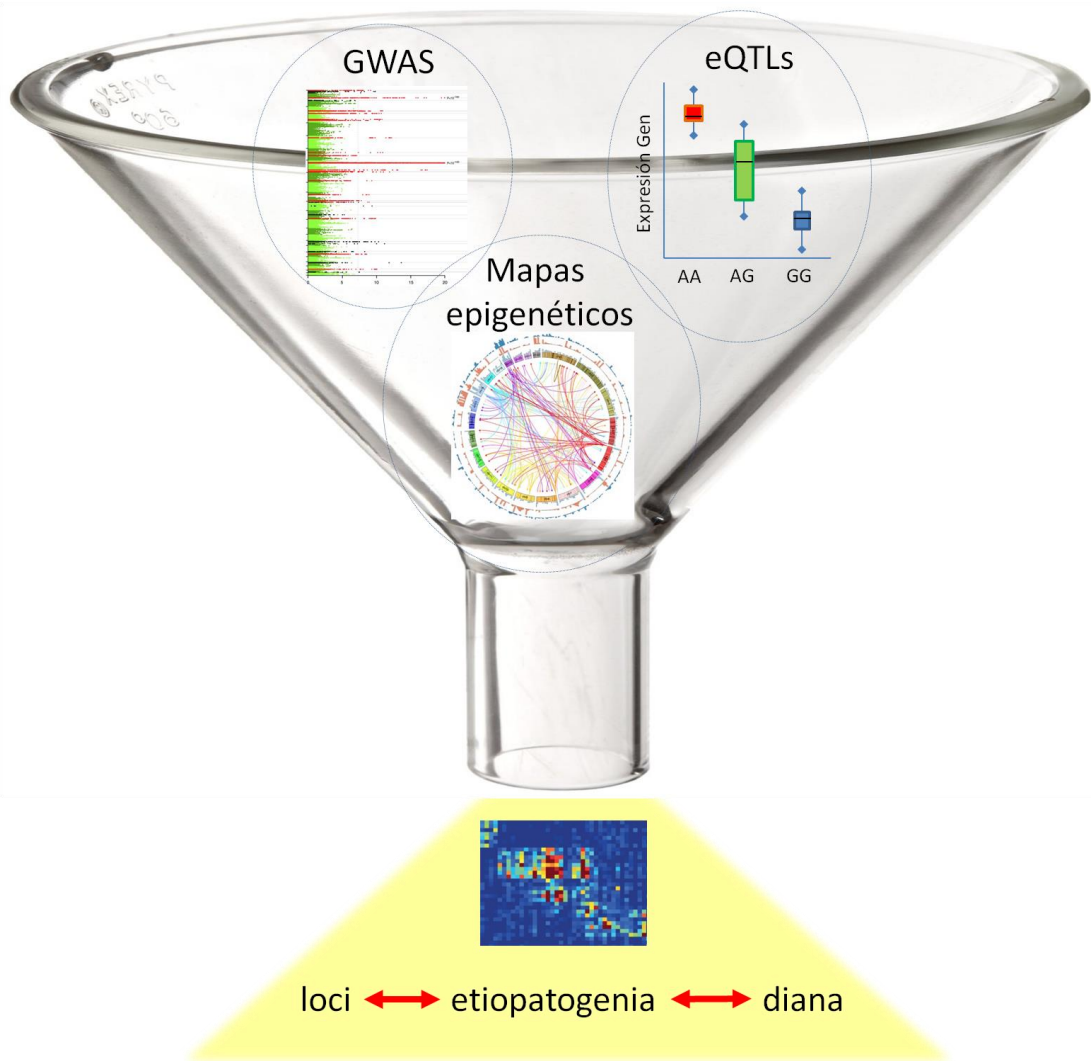


Figura representativa de los polimorfismos descritos en el ámbito de la AR por diferentes estudios y su interacción con la transcripción. Además, los SNPs descritos pueden encontrarse en *linkage disequilibrium* (*linkage disequilibrium*) con otros SNPs que pueden ser o no causales [256]. Abreviaturas: PICS SNP, SNP con alta probabilidad de ser una variante causal.

Para entender la posible función reguladora de las variantes genéticas descritas se han desarrollado investigaciones que han estudiado y descrito los eQTL (*expression quantitative trait*

*loci*), regiones del genoma que están fuertemente asociadas a la expresión. Los polimorfismos son variantes genéticas que pueden formar parte de las regiones eQTL y afectar a la expresión de *loci* cercanos, por ejemplo, alterando la secuencia de unión a un factor de transcripción [275, 276]. Estos avances han permitido describir eQTLs que pueden afectar a los mecanismos patogénicos subyacentes a la AR, ya que afectan a las células T [277, 278], a neutrófilos y monocitos (*PADI4*) [279], a la señalización de la vía NFκB mediada por CD40 [276], al inflamasoma o a la respuesta al tratamiento anti-TNFα [280].

**Figura 13.** Figura representativa del avance del estudio genético en AR por diferentes técnicas genómicas.



La interpretación de los GWAS, la descripción de regiones eQTL y la integración de la epigenómica están suponiendo un cambio en la genética de la AR que está permitiendo identificar nuevas rutas patogénicas y posibles dianas terapéuticas [271, 274, 281].

## 7.2. Hallazgos genéticos en regiones inmunomoduladoras

Dada la base inmunológica de la AR, muchos de los GWAS desarrollados hasta la fecha se han centrado en estudiar regiones inmuno-reguladoras del genoma. Un 60% de las asociaciones descritas corresponden a *loci* implicados en procesos inmunológicos [274].

### 7.2.1. Región HLA

La región *HLA* (antígeno de histocompatibilidad leucocitaria) representa la mayor señal de asociación genética descrita en la susceptibilidad de la AR. La región *HLA* se ubica en el cromosoma 6p21 y codifica, al menos, para 132 proteínas con importantes funciones en el sistema inmune. Esta región tiene una extensión de 3,6 Mb (0,13% del genoma humano) y se ha relacionado con más de una centena de enfermedades, muchas de ellas autoinmunes como la AR, la diabetes, el asma o la psoriasis. Esta región codifica para moléculas de clase I (*HLA-A*, *C* y *B*) y de clase II (*HLA-DR*, *DQ* y *DP*). Las moléculas de clase I poseen una cadena ligera soluble (12 kD,  $\beta$ 2-microglobulina) y una cadena pesada transmembrana (45 kD) que se unen al antígeno intracelular y lo presentan a las células T CD8+. Las moléculas de clase II son proteínas transmembrana con dos cadenas (cadena  $\alpha$  de 32 kD y cadena  $\beta$  de 28 kD) que presentan antígenos intra y extracelulares a las células T CD4+. La región *HLA* es una región hiperpolimórfica de la que se han descrito más de 12000 alelos. Estudios previos de la década de los 80 describieron múltiples alelos del gen *HLA-DRB1* asociados al riesgo de AR y que codifican para secuencias similares de aminoácidos entre las posiciones 70 y 74 (70Q/R-K/R-R-A-A74) de la tercera región hipervariable de la cadena DRB1, originando así la teoría del “epítipo compartido” [265]. Además, se ha descrito cierta correlación entre el epítipo compartido y la presencia de los anticuerpos anti-CCP y FR en los pacientes de esta enfermedad. Estudios recientes sugieren que los alelos del epítipo compartido (*HLA-DRB1\*SE*) pueden tener un papel funcional a través de la vía Th17/IL-17 en la AR [282]. Las investigaciones más recientes han confirmado que el locus *HLA-DRB1* que está asociado tanto al riesgo a desarrollar a AR como a la severidad radiológica, la mortalidad y la respuesta a determinados tratamientos [267]. En 1999, el Consorcio de Secuenciación MHC describió 225 genes dentro de la región *HLA* [283]. En el año 2012, el proyecto *The Encyclopedia of ADN Elements* (ENCODE) describió las regiones de unión a factores de transcripción en el genoma y los patrones de modificación de las histonas y de la estructura de la cromatina. Estas iniciativas junto con las últimas secuenciaciones de la región *HLA* mediante técnicas de secuenciación de nueva generación han permitido identificar numerosos eQTLs en esta región, destacando los eQTLs ubicados en la región del *HLA-DRB1*. Hosomichi y colaboradores han descrito recientemente 12 SNPs en esta región con funciones reguladoras y que asocian con el desarrollo de AR. Entre ellos destaca el rs660895, localizado en el *HLA-DRB1* y descrito como el alelo *HLA-DRB1\*04:01* y que asocia fuertemente con el riesgo de AR (*Odds Ratio*: 6,2) [284]. Aunque el *HLA-DRB1* es el gen más estudiado en AR, existen otras muchos genes asociados con la enfermedad en la región *HLA*, como por ejemplo, el *HLA-DQA1* y el *HLA-DQB1* o el epítipo *HLA-DR4* [285].

### 7.2.2. Regiones distintas al HLA (no-HLA)

Los estudios genéticos, ya sean GWAS o estudios de genes candidato, han permitido identificar numerosos genes que influyen en la susceptibilidad a desarrollar AR y que se localizan fuera de la región *HLA* [268, 269, 286, 287]. Entre ellos podemos destacar genes como el *TIM-3*, *TRAF1/C5*, *STAT4*, *CCR5*, *PADI4* y *FCGR2A* [288] pero sobretodo el *PTPN22*. Éste gen codifica para una fosfatasa que inhibe la señalización mediada por el receptor de las células T en las células hematopoyéticas y está implicado en la regulación de la respuesta inmune mediada por el

interferón. El *PTPN22* es clave en el equilibrio de la respuesta inmune y el polimorfismo *PTPN22*<sub>rs2476601</sub>, que afecta a la función normal de la proteína [289], ha sido descrito como una de las variaciones genéticas más importantes en AR fuera del HLA. Es necesario mencionar además que los estudios de genética han permitido identificar variaciones genéticas asociadas con determinadas condiciones clínicas como es la presencia de factor reumatoide o anticuerpo contra péptidos citrulinados que han permitido ahondar en el conocimiento de las vías etiopatogénicas de la AR (*PTPN22*, *IRF5*, *BLK*, *UBE2L3*, *STAT4*, *IRF8*, *DDX6*, *CXCR5*, *PRDM1* y *ATG5*) [290]. Un ejemplo particular lo constituye el gen *PAID4* que ha sido identificado en estudios GWAS y ha permitido confirmar la implicación de la citrulinación como mecanismo etiopatogénico en la AR [290].

Los GWAS además están siendo de gran utilidad para la identificación de dianas terapéuticas en AR [262, 271, 291] y han permitido validar la relevancia de ciertas moléculas que ya se usaban como dianas terapéuticas. Sirva como ejemplo moléculas como el IL-6R (tocilizumab), el CTLA4 (abatacept) o el TNF $\alpha$  (fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$ )[292]. Una prueba de ello lo constituyen el gran número de estudios de farmacogenómica que se han llevado a cabo para evaluar el impacto de variantes genéticas en la vía del TNF $\alpha$ , algunos centrados directamente en esta ruta [293, 294], y que han permitido identificar polimorfismos asociados a la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  (*TNF $\alpha$* , *TNFRSF1B*, *TNFRSF9*, *IL-10*, *DHODH*, *ESR1* o *CYP1A2*)[292-299]. Sin embargo, todavía son muchas las variantes genéticas que quedan por identificar en relación a la respuesta terapéutica.

Por otro lado y siguiendo un diseño basado en hipótesis biológicamente plausibles, los estudios de genes candidato han contribuido también a identificar variaciones genéticas asociadas con AR [300, 301]. El desarrollo de estos estudios ha destacado el importante papel que tienen, por ejemplo, ciertas variaciones genéticas en genes inmunorreguladores [292] no sólo en determinar el riesgo a desarrollar AR si no, además, la respuesta terapéutica de los pacientes tras la administración de ciertos fármacos. Entre los genes identificados podemos destacar ciertas interleuquinas y sus receptores (*IL4*, *IL4R*, *IL12RA*, *IL12RB*, *IL10*, *IL2*, *IL1B*)[302-306], moléculas de adhesión (*CD40*)[307], receptores como las lectinas (*DC-SIGN*, *Dectina-1*)[287] o receptores de las células T (*TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TLR7*), así como genes que intervienen en la vía de la IL17 (*IL-6*, *CCR6*, *CCL20*) [286]. Este tipo de estudios están resultando de enorme utilidad para acercarnos a un tratamiento más individualizado y adaptado al riesgo de cada paciente, objetivo que sigue siendo prioritario de la mayoría de los clínicos e investigadores que trabajan en AR.

### 7.2.3. Regiones relacionadas con las hormonas esteroideas

Estudios epidemiológicos han sugerido que las hormonas esteroideas, a través de su participación en el control de la respuesta inmune, podrían estar implicadas en el desarrollo de la AR. Estudios desarrollados en la última década han demostrado que las hormonas esteroideas no sólo juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune sino que, además, están implicadas en la progresión de la enfermedad e incluso en la respuesta terapéutica [65-67]. Bajo esta premisa, algunos investigadores han orientado sus esfuerzos hacia la búsqueda de variantes genéticas en genes relacionados con la síntesis, degradación o transporte de las hormonas esteroideas, que pudieran estar implicadas tanto en los mecanismos moleculares que determinan la aparición de la AR como en los procesos que condicionan la progresión de la enfermedad o la respuesta terapéutica. En el año 2000, Fife y colaboradores descubrieron que el factor de liberación de la corticotropina (CRH) es un *locus* asociado a la AR familiar que influye en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y constituye un elemento clave en el control de

la inflamación [308]. Reyes-Castillo y colaboradores además describieron una variante en el promotor del gen de la prolactina (*PRL*) relacionado con la expresión de la hormona y que asocia con el riesgo de AR y los niveles de anticuerpos anti-CCP [309]. Casi de forma simultánea, John y colaboradores (1999) demostraron que el *CYP19* interviene en la síntesis de los estrógenos y que es un *locus* asociado al desarrollo de la enfermedad [310]. Otros investigadores han enfocado sus estudios en la vía de la vitamina D, una hormona esteroidea que también influye en la respuesta inmune, y demostraron que la presencia de variaciones genéticas en su receptor (VDR) (*FokI*, *BsmI*, y *TaqI*) también asocian con el riesgo a desarrollar la enfermedad [311]. Estos estudios constituyen sólo un ejemplo de la importancia que parecen tener las hormonas esteroideas en la AR. Estudios más recientes han sugerido además un papel relevante de variantes en genes como los receptores de los estrógenos (*ESR1* y *ESR2*) [312-314], o los genes implicados en el metabolismo de las hormonas (*CYP5A*) y que son capaces de modular tanto el efecto de las hormonas como sus niveles [315]. Algunos estudios más recientes han evaluado también el papel de variantes genéticas en *ESR1* o *CYP1A2* en la modulación de la respuesta terapéutica [295].

### 7.3. Modelos predictivos de susceptibilidad a AR y respuesta terapéutica

Como hemos mencionado con anterioridad, los estudios de base genética han demostrado ser de gran utilidad para la identificación de los genes implicados en los mecanismos subyacentes a AR [274] e incluso en los mecanismos biológicos implicados en la determinación de la respuesta terapéutica [293, 298, 316-319]. Sin embargo, a pesar de los enormes esfuerzos empleados por la comunidad científica, aún no ha sido posible trasladar a la clínica la mayor parte de los descubrimientos en este área, en parte debido a que el efecto individual de dichas variantes suele ser moderado (baja penetrancia). En este contexto, los investigadores y los clínicos han tratado de establecer modelos que, en lugar de considerar las variantes genéticas como entes que afectan a la susceptibilidad o la respuesta terapéutica de forma aislada, puedan ayudar a integrar la información genética y clínica para predecir con mayor efectividad el riesgo a desarrollar AR y, lo que es más importante, la respuesta terapéutica de los pacientes. Teniendo en cuenta el elevado coste socioeconómico de esta enfermedad autoinmune (debido a su prevalencia) y el elevado porcentaje de pacientes que presentan fracaso terapéutico, resulta imprescindible desarrollar herramientas aplicables a la clínica que ayuden a identificar el pronóstico de cada paciente y mejorar la ratio coste/efectividad de los tratamientos empleados. No obstante, a pesar de este nuevo enfoque y los avances de los últimos años en esta área, se han desarrollado pocos modelos sólidos que permitan predecir con certeza la aparición de la enfermedad o la respuesta a los diferentes tipos de tratamientos. Dichos modelos además no han sido validados.

Entre ellos podemos destacar el modelo predictivo desarrollado por van der Helm-van en 2007 que permitió predecir el porcentaje de los pacientes con artritis indiferenciada que desarrollan AR (30% frente al 1% que presenta la población general) [320]. Además de los modelos orientados a predecir AR, hasta la fecha se han descrito varios los modelos que han intentado, a través de la combinación de factores clínicos y ambientales en el contexto de ensayos clínicos (ASPIRE, BeST, SWEFOT y ESPOIR), predecir la progresión de la enfermedad (o la progresión radiológica). Algunos de estos modelos han considerado parámetros como el MBDA (*multi-biomarker disease activity*) y el SCORE (*systematic coronary risk evaluation*) [321]. A pesar de la utilidad de estos modelos, ninguno de ellos incluye marcadores genéticos. Aunque los modelos predictivos con marcadores genéticos son aún escasos y requieren de validación, su capacidad predictiva parece ser mayor que la de los modelos que carecen de ellos. Esto sugiere que la identificación de nuevas



variantes genéticas susceptibles de ser incluidas en estos modelos puede ayudar a mejorar la capacidad predictiva de los mismos y permitir su uso en la clínica [322, 323]. Un ejemplo que apoya esta afirmación lo constituye el modelo predictivo desarrollado por Wessels y colaboradores (2007) y en el que contemplan el uso de cuatro marcadores genéticos junto a otras variantes clínicas y ambientales para predecir la respuesta al tratamiento con metotrexato [324]. El modelo predictivo más completo en cuanto al número de marcadores genéticos incluidos es el desarrollado por A. Yarwood et al. (2015) que incluía 46 *loci* asociados con AR. Sin embargo, dicho modelo tiene aún una capacidad predictiva modesta y evidencia la necesidad de desarrollar modelos más completos que integren marcadores genéticos con mayor capacidad predictiva [325].

En conclusión, es necesario evaluar y describir los factores de riesgo clínicos, genéticos y ambientales, para avanzar en el tratamiento personalizado de la AR. Profundizando en los campos de la farmacogenética y la clínica es posible que se consiga construir nuevos modelos predictivos de susceptibilidad o respuesta terapéutica que puedan ser instaurados en la clínica y permitan el desarrollo de una medicina más eficaz y adaptada al riesgo de cada paciente.



# *JUSTIFICACIÓN*

---



La AR es una enfermedad autoinmune de etiología compleja y en gran medida desconocida que se caracteriza por una inflamación del sinovio, infiltrado celular y neoangiogénesis que conduce a la destrucción del tejido articular y, en ocasiones, a manifestaciones extra-articulares severas como la vasculitis, los nódulos reumatoideos, las infiltraciones cutáneas y el síndrome de Sjögren. La AR es una enfermedad de difícil diagnóstico que parece desencadenarse como resultado de la interacción entre determinados factores genéticos, ambientales y hormonales.

Los estudios de heredabilidad muestran la existencia de un fuerte componente genético en AR (60% aproximadamente) lo que implica que la presencia de ciertas variaciones genéticas en determinadas regiones del genoma puede modular la respuesta inmune y, por tanto, determinar el riesgo a desencadenar la enfermedad. Además, un creciente número de estudios genéticos sugieren que ciertas variaciones genéticas pueden influir en el grado de severidad de los síntomas y en la progresión de la enfermedad así como en la respuesta a los diferentes tipos de tratamiento.

En los últimos años el exhaustivo análisis molecular y genético ha revelado la existencia de más de un centenar de variantes genéticas asociadas con el riesgo a desarrollar AR y con la progresión de la enfermedad o la respuesta terapéutica. Sin embargo, a pesar de los importantes esfuerzos realizados hasta la fecha en áreas como la genética, la farmacogenómica o la farmacogenética, el uso de marcadores genéticos en el ámbito clínico es todavía muy limitado.

Debido a la elevada prevalencia de la AR y al alto grado de refractariedad de los tratamientos actuales, se hace imprescindible el desarrollo de nuevas herramientas que nos permitan adaptar el tratamiento al riesgo de cada paciente y predecir el grado de progresión que presentará el paciente así como el nivel de respuesta que presente a los tratamientos que se le administren.

Es importante además ahondar en aspectos tan relevantes como el efecto del género en la AR. La prevalencia de la AR es tres veces mayor en mujeres que en hombres y estas diferencias también parecen estar mediadas, al menos en parte, por factores genéticos. Las mujeres suelen presentar una sintomatología más severa de la enfermedad y una progresión más rápida lo que, sin duda, puede estar también determinado a nivel genético. Así pues, se hace necesario investigar más en profundidad el papel que tienen ciertos polimorfismos en genes implicados en la señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas en la modulación de la respuesta inmune y su impacto tanto en la susceptibilidad a AR como en la progresión y la respuesta a los diferentes tipos de tratamiento.



# *OBJETIVOS*

---





El objetivo general de esta tesis es ahondar en el conocimiento de los factores genéticos que influyen en el riesgo a desarrollar a AR e identificar polimorfismos genéticos que determinen la respuesta al tratamiento con fármacos biológicos para así poder diseñar modelos que nos permitan predecir la respuesta a la terapia y poder establecer patrones de tratamiento más individualizados y adaptados al riesgo de cada paciente.

Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

1. Analizar si la presencia de polimorfismos de un único nucleótido o haplotipos localizados en genes inmunomoduladores influyen sobre el riesgo a desarrollar AR o la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  y evaluar si el impacto de las variantes analizadas puede deberse a interacciones SNP-SNP o si presentan un efecto asociado específicamente al género.
2. Determinar si los polimorfismos de un único nucleótido en genes relacionados con las vías de señalización, el metabolismo o el transporte de las hormonas esteroideas pueden determinar el riesgo a desarrollar AR o la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$ .
3. Confirmar las asociaciones observadas en nuestra población mediante meta-análisis de nuestros datos con aquellos de estudios GWAS previamente publicados.
4. Identificar el posible papel funcional de las variantes más destacadas y diseñar un modelo que combine parámetros clínicos y variantes genéticas en genes de los sistemas inmune y hormonal que mejore significativamente la capacidad predictiva del riesgo a desarrollar AR y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ .



# *ANEXO PUBLICACIONES*

---



# *Artículo primero*

---

## ***Gender-Specific Effects of Genetic Variants within Th1 and Th17 Cell-Mediated Immune Response Genes on the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis***

---

***Introducción y objetivos:*** El presente estudio se desarrolló con el objetivo de investigar si la presencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes relacionados con la respuesta inmune dirigida por las células Th1 y Th17 podía influir sobre el riesgo a desarrollar AR y si el efecto de dichos polimorfismos podría ser dependiente del género.

***Materiales y métodos:*** Este estudio se desarrolló en dos fases. En la primera fase se genotiparon con sondas KASPar® (LGC Genomics) 27 SNPs (seleccionados por funcionalidad y *tagging*) en los genes de lectinas del tipo C (DC-SIGN, Dectina-1 y Dectina-2) y en el eje *MCP1/CCR2* en 458 pacientes diagnosticados con AR y en 512 controles sanos. En la segunda fase, se validaron los resultados potencialmente interesantes en una población de 754 pacientes de AR y 519 controles sanos. Los pacientes con AR fueron diagnosticados en base a los criterios establecidos por el ACR y el EULAR y los análisis de asociación se realizaron mediante análisis de regresión logística ajustados por edad y género. El análisis combinado de ambas poblaciones se ajustó por edad, género y centro de origen mientras que el análisis estratificado por género se ajustó por edad. Los valores de asociación se expresaron en términos de *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confianza (IC) y nivel de significación estadística se estableció siguiendo la corrección de *Meff* que considera el número de marcadores independientes analizados y los modelos de herencia testados ( $P=0,002$ ). Los análisis de interacción SNP-SNP y SNP-género se realizaron mediante el software *multifactor dimensionality reduction* (MDR) y fueron confirmados por regresión logística. La funcionalidad de los polimorfismos analizados se evaluó *in silico* mediante consulta de bases de datos de expresión génica previamente establecidas o a través del análisis del efecto de los SNPs seleccionados sobre la función de factores de transcripción o el splicing, entre otros procesos.

***Resultados:*** Los resultados de la primera fase mostraron que los individuos portadores del alelo *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> tenían un mayor riesgo a desarrollar AR (OR=1,47, 95%IC 1,10–1,96), mientras que aquellos portadores de los alelos *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub>, *MCP1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP1*<sub>rs13900T</sub> y *MCP1*<sub>rs4586C</sub> mostraban un menor riesgo a desarrollar la enfermedad (OR=0,66, 95%CI 0,49–0,88; OR=0,66, IC 95% 0,50–0,89; OR=0,73, IC 95% 0,55–0,97 y OR=0,68, IC 95% 0,51–0,91). Además, fue interesante observar que el efecto de los SNPs analizados en Dectina-2 era dependiente del género. Así, las mujeres portadoras de los alelos *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> y *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> presentaban un riesgo significativamente mayor a desarrollar AR (OR=1,93, IC 95% 1,34–2,79 y OR=1,90, IC 95% 1,29–2,80) mientras que el efecto, aunque no era estadísticamente significativo, era contrario en los hombres. Por otra parte, descubrimos que 5 SNPs que presentaban efectos sólo en un género: las mujeres portadoras de los alelos *MCP1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP1*<sub>rs13900T</sub> y *MCP1*<sub>rs4586C</sub> presentaban un menor riesgo a desarrollar AR (OR=0,61, IC 95% 0,43–0,87; OR=0,67, IC 95% 0,47–0,95 y OR=0,60, IC 95% 0,42–0,86) mientras que los hombres portadores del alelo *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> o *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> presentaban un riesgo significativamente mayor y menor de desarrollar la enfermedad (OR=1,70, IC 95% 1,03–2,78 y OR=0,53, IC 95% 0,32–0,89, respectivamente). Los resultados de la segunda fase confirmaron un impacto significativo de los polimorfismos *Dectina-2*<sub>rs4264222</sub>, *MCP1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP1*<sub>rs13900</sub> y *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub> sobre el riesgo a desarrollar AR (OR=1,38, IC 95% 1,08–1,77; OR=0,74, IC 95% 0,58–0,94; OR=0,76, IC 95% 0,59–0,97 y OR=0,56, IC 95% 0,34–0,93). Finalmente, nuestro estudio permitió identificar un modelo de interacción en hombres en *Dectina-2* (rs4264222 y rs7134303) que sugería un efecto sinérgico de estos SNPs para determinar el riesgo de la enfermedad.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la presencia de determinados SNPs en los genes *Dectina-2*, *MCP1* y *DC-SIGN* pueden influir en el riesgo a desarrollar AR y explicar, al menos en parte, las diferencias de incidencia asociadas al género.

# Gender-Specific Effects of Genetic Variants within Th1 and Th17 Cell-Mediated Immune Response Genes on the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis

Rafael Cáliz<sup>1,9</sup>, Luz María Canet<sup>2,9</sup>, Carmen Belén Lupiáñez<sup>2</sup>, Helena Canhão<sup>3,4</sup>, Alejandro Escudero<sup>5</sup>, Ileana Filipescu<sup>5</sup>, Juana Segura-Catena<sup>2</sup>, María José Soto-Pino<sup>1</sup>, Manuela Expósito-Ruiz<sup>6</sup>, Miguel Ángel Ferrer<sup>1</sup>, Antonio García<sup>1</sup>, Lurdes Romani<sup>1</sup>, Alfonso González-Utrilla<sup>1</sup>, Teresa Vallejo<sup>1</sup>, Eva Pérez-Pampin<sup>7</sup>, Kari Hemminki<sup>8,9</sup>, Asta Försti<sup>8,9</sup>, Eduardo Collantes<sup>5</sup>, João Eurico Fonseca<sup>3,4</sup>, Juan Sainz<sup>2,8\*</sup>

**1** Rheumatology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain, **2** Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Granada, Spain, **3** Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, **4** Rheumatology Department, Santa Maria Hospital—CHLN, Lisbon, Portugal, **5** Rheumatology Department, Reina Sofía Hospital, Córdoba, Spain, **6** FIBAO Foundation, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain, **7** Rheumatology Unit, Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain, **8** Division of Molecular Genetic Epidemiology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, **9** Center for Primary Health Care Research, Clinical Research Center, Malmö, Sweden

## Abstract

The present study was conducted to explore whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Th1 and Th17 cell-mediated immune response genes differentially influence the risk of rheumatoid arthritis (RA) in women and men. In phase one, 27 functional/tagging polymorphisms in C-type lectins and MCP-1/CCR2 axis were genotyped in 458 RA patients and 512 controls. Carriers of *Dectin-2*<sub>rs4264222T</sub> allele had an increased risk of RA (OR = 1.47, 95%CI 1.10–1.96) whereas patients harboring the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900T</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> alleles had a decreased risk of developing the disease (OR = 0.66, 95%CI 0.49–0.88; OR = 0.66, 95%CI 0.50–0.89; OR = 0.73, 95%CI 0.55–0.97 and OR = 0.68, 95%CI 0.51–0.91). Interestingly, significant gender-specific differences were observed for *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> and *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub>: women carrying the *Dectin-2*<sub>rs4264222T</sub> and *Dectin-2*<sub>rs7134303G</sub> alleles had an increased risk of RA (OR = 1.93, 95%CI 1.34–2.79 and OR = 1.90, 95%CI 1.29–2.80). Also five other SNPs showed significant associations only with one gender: women carrying the *MCP-1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900T</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> alleles had a decreased risk of RA (OR = 0.61, 95%CI 0.43–0.87; OR = 0.67, 95%CI 0.47–0.95 and OR = 0.60, 95%CI 0.42–0.86). In men, carriers of the *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> allele had an increased risk of RA (OR = 1.70, 95%CI 1.03–2.78), whereas carriers of the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> had a decreased risk of developing the disease (OR = 0.53, 95%CI 0.32–0.89). In phase 2, we genotyped these SNPs in 754 RA patients and 519 controls, leading to consistent gender-specific associations for *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900</sub> and *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub> polymorphisms in the pooled sample (OR = 1.38, 95%CI 1.08–1.77; OR = 0.74, 95%CI 0.58–0.94; OR = 0.76, 95%CI 0.59–0.97 and OR = 0.56, 95%CI 0.34–0.93). SNP-SNP interaction analysis of significant SNPs also showed a significant two-locus interaction model in women that was not seen in men. This model consisted of *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> and *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> SNPs and suggested a synergistic effect between the variants. These findings suggest that *Dectin-2*, *MCP-1* and *DC-SIGN* polymorphisms may, at least in part, account for gender-associated differences in susceptibility to RA.

**Citation:** Cáliz R, Canet LM, Lupiáñez CB, Canhão H, Escudero A, et al. (2013) Gender-Specific Effects of Genetic Variants within Th1 and Th17 Cell-Mediated Immune Response Genes on the Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE 8(8): e72732. doi:10.1371/journal.pone.0072732

**Editor:** Yong-Gang Yao, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, China

**Received:** January 23, 2013; **Accepted:** July 12, 2013; **Published:** August 30, 2013

**Copyright:** © 2013 Cáliz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was partially supported by grants P08-CVI-4116 from Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Sevilla, Spain) and PI08/1051 and PI12/02688 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Madrid, Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: juan.sainz@genyo.es

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammatory activity in the synovial joints often leading to progressive cartilage and bone destruction [1]. Although etiology of RA is still unknown, it has been suggested that activated macrophages and dendritic cells (DCs), rather than T-cells, may be important for the onset of the disease. In the RA synovium, macrophages mature into tissue macrophages and differentiate

into DCs leading to massive release of a wide number of pro-inflammatory mediators [2–4] and to the induction of adhesion (C-type lectins) and co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86) that participate in the activated macrophage- and DC-induced T-cell proliferation [5,6]. Among all these immune mediators, *MCP-1/CCL2*, a chemokine highly expressed in the synovial fluid of RA patients [7], binds to CCR2 and promotes the recruitment of antigen-presenting cells and T cells [8] whereas C-type lectins such as *Dectin-1*, *Dectin-2* and *DC-SIGN* regulate the



monocyte-induced T-cell activation in the RA synovium [5,6]. C-type lectins also modulate adaptive immune responses, of which especially Th17 responses are implicated in the stimulation of osteoclastogenesis and bone destruction during RA [9].

RA is three times more frequent in women than men [10] and emerging data also suggest that women are more likely to present a worse course of the disease and to become severely disabled [11,12]. Although different hypotheses concerning sex-related differences in RA incidence and severity have been generated, the hypothesis suggesting a sexual dimorphism in the intensity of immune responses remains as one of the most probable mechanisms in promoting and establishing a different synovial membrane inflammation and, subsequently, different levels of cartilage and bone erosion [13,14]. Women have higher immunoglobulin levels than men, they show stronger Th1-type cell-mediated immune responses and they have higher absolute numbers of CD4<sup>+</sup> lymphocytes and a more proactive cytokine profile [15,16], which likely contribute to their increased autoimmune responses [17]. Experimental studies in rodents have also shown different immune responses between female and male animals and an equivalent sexual dimorphism in the incidence of RA [18]. The underlying reasons for this gender bias are still unknown, but studies in monozygotic twins have suggested that genetic factors may, at least in part, account for sex-related differences in the immune responses [19] and, consequently, in the susceptibility to autoimmune diseases. Genetic factors implicated in RA have been widely studied using both candidate genes [20] and whole-genome screens [21] but, so far, only a few studies have investigated the link between SNPs and the gender-associated differences in susceptibility to RA [22,23]. Considering these facts, the present study was designed to evaluate the influence of 27 tagging and potentially functional SNPs within the *MCP-1*, *CCR2*, *DC-SIGN*, *Dectin-1*, and *Dectin-2* genes in the risk to develop RA in women and men, separately.

## Materials and Methods

### Study Population

In phase 1, all participants enrolled were Caucasian and recruited at the department of Rheumatology of the Virgen de las Nieves (Granada, Spain) and Reina Sofía (Córdoba, Spain) hospitals. All participants gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the ethical review committee of participant institutions (Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain; Reina Sofía Hospital, Córdoba, Spain). The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. The population consisted of 970 participants, 458 RA patients (360 women and 98 men) and 512 healthy controls (217 women and 295 men). Rheumatoid patients were treated at their respective departments of Rheumatology from January 2004 to January 2010. The diagnosis of RA was assigned by physician investigators and fulfilled the 1987 American College of Rheumatology (ACR) criteria. We chose DAS28 as a measure of disease activity as it is a validated score for established RA. Moderate to high activity disease was defined as DAS28 $\geq$ 3.2 while low disease activity was defined as DAS28<3.2. Controls were blood donor subjects randomly recruited at the Regional Blood Transfusion and Tissue Centre (Granada-Almería, Spain).

In phase 2, in order to increase the statistical power of the study and confirm both overall and gender-specific associations, we extended the study by recruiting additional RA cases (n = 831) and controls (n = 550) from our own institution as well as from other collaborating institutions. Seven hundred and seventy-three RA

patients and 201 controls were recruited from the Santa Maria Hospital-CHLN (Lisbon, Portugal). Fifty-eight additional RA patients were recruited from the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spain). We also recruited 349 healthy controls from our own institution (Virgen de las Nieves University hospital, Granada, Spain; n = 260) as well as from the Reina Sofía hospital (Córdoba, Spain; n = 89). All participants gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the respective ethical review committee of participant institutions. Thirty-four non-Caucasian subjects were excluded from the statistical analyses (n = 34) and some additional patients and controls were also removed for technical reasons (low DNA quality, unknown age or gender, etc.). Seven hundred and fifty-four RA patients (626 women and 128 men) and 519 healthy controls (348 women and 171 men) were finally available for genotyping.

### SNP Selection and Genotyping

Twenty-seven tagging/functional SNPs within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *MCP-1* and *CCR2* were selected to genotype the entire panel of individuals (Table 1; Supplementary material). The aim of the SNP tagging was to identify a set of SNPs that efficiently tags all the known SNPs while the functional approach was used to determine the net impact of potentially functional variants within *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *MCP-1* and *CCR2* genes on RA risk. Tagging SNPs were selected using Haploview Tagger program (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>; <http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger/>). SNPs with a MAF>0.05 were included in the selection of tag SNPs using a pairwise tagging with a minimum  $r^2$  of 0.8. In this selection we forced the inclusion of the *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024610</sub> and *MCP-1*<sub>rs1024611</sub> polymorphisms as their functionality has been suggested [24–26]. One extra SNP within *DC-SIGN* (rs11465384) and in strong linkage disequilibrium (LD) with at least 4 SNPs was selected as redundant SNP in case of genotyping failure. Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Qiagen Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Genotyping of *DC-SIGN*, *Dectin-1*, *Dectin-2*, *MCP-1* and *CCR2* polymorphisms was carried out using allele-specific KASPar<sup>®</sup> assays (LGC Genomics KBioscience, London, United Kingdom) in a 384-well plate format (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) where population samples (RA and healthy controls) were randomly distributed. KASPar reactions were performed using KASPar assay mix (containing probes) and KASPar kit containing 2X Reaction Mix and MgCl<sub>2</sub> (50 mM). Touch-down PCR conditions were: denaturation at 94°C for 15 min, 10 cycles of denaturation at 94°C for 20 sec, annealing at 61°C for 60 sec (dropping -0.6°C per cycle) and 26 cycles of denaturation at 94°C for 10 sec, annealing at 55°C for 60 sec. Recycling conditions were 94°C for 10 sec, annealing and elongation at 60°C for 60 sec. PCR products were analyzed with the ABI Prism 7900HT detection system using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). For internal quality control, 5% of samples were randomly selected and included as duplicate. Concordance between the original and the duplicate samples for the 27 SNPs analyzed was  $\geq$ 99.0%. Call rates for all SNPs were  $\geq$ 95.0% with the exception of the *Dectin-1*<sub>rs11053599</sub> SNP with a call rate <90.0%. This latter SNP was excluded from further analysis.

### Statistical Analysis

The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) tests were performed in the control group by a standard observed-expected chi-square ( $\chi^2$ ) test at each polymorphic site (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Binary logistic regression

**Table 1.** Selected SNPs within DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, MCP-1 and CCR2 genes.

Gene and SNP position	dbSNP rs#	Location	Aa change	Nucleotide substitution	MAF †	Hypothetical function and/or reported associations related to autoimmune and/or infection disorders	References*
DC-SIGN_c.-139	rs2287886	Promoter	-	A/G	0.32	Affects transcriptional activity and DC-SIGN mRNA expression level; associated with protection against IPA infection; associated with several infection and immune-related diseases such as HCMV, HIV-1, Dengue, TB, parenteral infection, SARS.	[1–5]
DC-SIGN_c.-336	rs4804803	Promoter	-	A/G	0.24	Affects transcriptional activity and DC-SIGN mRNA expression; associated with risk of parenteral infection, HIV-1, HCV, dengue and tuberculosis.	[5–11]
DC-SIGN_c.2797	rs4804800	3'-UTR	-	A/G	0.13	3'-UTR affecting RNA expression; associated with an increased risk of IPA infection	[12]
DC-SIGN_c.342+2863	rs8112310	5' near gene	-	A/T	0.16	Potential activity affecting DC-SIGN expression	-
DC-SIGN_IV56 -326	rs10410342	Intron	-	C/G	0.07	Unknown	-
DC-SIGN_c.749-28	rs11465384	Intron	-	C/T	0.09	Associated with an increased risk of IPA infection	[12]
DC-SIGN_c.1974	rs11465413	3'-UTR	-	A/T	0.10	3'-UTR affecting RNA expression	-
DC-SIGN_IV52+11	rs7252229	Intron	-	G/C	0.16	Associated with an increased risk of IPA infection	[12]
DC-SIGN_c.898	rs7248637	3'-UTR	-	A/G	0.11	3'-UTR affecting RNA expression; associated with an increased risk of IPA infection	[12]
DC-SIGN_c.2629	rs11465421	3'-UTR	-	A/C	0.42	3'-UTR affecting RNA expression	-
Dectin-1 (CLEC7A)_c.714	rs16910526	Coding exon	Y238X	A/C	0.08	Defective expression of Dectin-1, lack of b-glucan recognition by phagocytes and defective production of cytokines; associated with increased Aspergillus and Candida colonization in hematopoietic transplant recipients	[13–15]
Dectin-1 (CLEC7A)_c.375-1148	rs11053599	Intron	-	A/C	-	Unknown	-
Dectin-1 (CLEC7A)_c.375-1404	rs7309123	Intron	-	C/G	0.42	Associated with an increased risk of IPA infection	[12]
Dectin-1 (CLEC7A)_c.255+813	rs3901533	Intron	-	G/T	0.24	Associated with an increased risk of IPA infection	[12]
Dectin-1 (CLEC7A)_c.104-520	rs4763446	Intron	-	C/T	0.15	Unknown	-
Dectin-1 (CLEC7A)_c.104-811	rs16910631	Intron	-	C/T	0.07	Unknown	-
Dectin-1 (CLEC7A)_c.103+732	rs7311598	Intron	-	A/G	0.16	Unknown	-
Dectin-2 (CLEC6A)_c.369+338	rs7134303	Intron	-	A/G	0.18	Unknown	-
Dectin-2 (CLEC6A)_c.122-425	rs4264222	Intron	-	C/T	0.22	Unknown	-
Dectin-2 (CLEC6A)_c.32-699	rs4459385	Intron	-	C/T	0.25	Unknown	-
MCP-1 (CCL2)_c.903	rs4586	Coding exon	C35C	C/T	0.48	Associated with an increased risk of TB	[16,17]
MCP-1 (CCL2)_c.2136	rs1024610	Promoter	-	A/T	0.23	Unknown	-
MCP-1 (CCL2)_c.-2518	rs1024611	Promoter	-	C/T	0.25	Correlate with MCP-1 mRNA expression and influence on the risk of TB, asthma, COPD, HCV and HBV infections	[16,18–23]



Table 1. Cont.

Gene and SNP position	dbSNP rs#	Location	Aa change	Nucleotide substitution	MAF †	Hypothetical function and/or reported associations related to autoimmune and/or infection disorders	References*
MCP-1 (CCL2)_c-1543	rs13900	3'-UTR	-	C/T	0.24	Unknown	-
CCR2_c-1221	rs3918358	Promoter	-	A/C	0.31	Unknown	-
CCR2_c667	rs743660	3'-UTR	-	A/G	0.25	Associated with an increased risk for COPD	[23,24]
CCR2_Ex2+241	rs1799864	Coding exon	V64I	A/G	0.10	Associated with slower progression to HIV	[23,24]

Abbreviations: UTR, untranslated region; IPA, Invasive Pulmonary Aspergillosis; TB, Tuberculosis; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; HCV, Hepatitis C virus; HBV, Hepatitis B virus; HIV-1, Human immunodeficiency virus-1;

SARS, acute severe respiratory syndrome.

†Minor allele frequency found in our population (458 RA patients and 512 controls).

\*Tagging details and references are included as Supplementary material.

doi:10.1371/journal.pone.0072732.t001

was used to assess the main effects of the genetic polymorphisms on RA risk using co-dominant and dominant inheritance models. For each SNP, the more common allele in the control group was assigned as the reference category. Binary logistic regression analyses were adjusted for age and gender whereas gender-stratified analyses were adjusted for age. In the pooled analysis, overall binary logistic regression analyses were adjusted by age, gender and centre whereas gender-stratified analyses were adjusted for age and centre. Statistical power was estimated using Quanto software (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). All analyses were conducted using the statistical software SSPS (version 14.0, SPSS Inc., Chicago, USA). All tests were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ . In order to correct for multiple testing, we calculated an adjusted significance level using  $M_{eff}$  correction. We estimated an individual  $M_{eff}$  value for each gene (i.e. the effective number of independent variables) and the study-wise  $M_{eff}$  value was estimated by adding up the independent gene  $M_{eff}$  values by using the SNP Spectral Decomposition Lite program (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSPdsuperlite/>) [27]. The resulting number of independent marker loci was applied to correct for multiple testing.

### Functional Prediction of Associated SNPs

We used a web-based tool FastSNP (available at <http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) for predicting the functional significance of the SNPs associated with RA. A detailed explanation on the FastSNP tool has been described elsewhere [28]. FastSNP utilizes information from different web resources (Hapmap, dbSNP, NCBI Blast, Polyphen, SNPs3D, TRANSFAC, ESEfinder, Rescue-ESE and FAS-ESS) to determine whether SNPs are located at exonic splicing regulatory sites or whether they alter the transcription factor-binding site of a gene (for instance, acting as intronic enhancer) or even whether SNPs are affecting Micro-RNA binding sites. In addition, these tools are able to identify either nonsense or non-synonymous SNPs that lead to premature termination of translation or amino acid changes and that are, therefore, very likely to affect protein function.

### SNP-SNP Interaction Analysis

We also analyzed high-order interactions between significant SNPs using the multifactor dimensionality reduction (MDR) constructive induction algorithm. A detailed explanation on the MDR method has been described elsewhere [29]. Cross-validation and permutation testing were used to identify the best models. All possible two-way SNP interactions were tested using 10-fold cross-validation and the exhaustive search. The model with the highest testing balanced accuracy (TA) and cross validation consistency (CVC) was selected as "best model". Statistical significance was evaluated by the Sign test and confirmed using a 1,000-fold permutation test to compare observed testing balanced accuracies with those expected under the null hypothesis of no association (using the MDR permutation testing module 0.4.9 alpha) [29]. MDR results were considered statistically significant at the level of 0.05. MDR software and MDR permutation testing module are open-source and freely available from <http://www.epistasis.org>. Logistic regression analyses were also performed to confirm significant interaction results from MDR analyses.

### Results

Demographic and clinical characteristics of the RA patients analysed in phase 1 are described in Table 2. Controls were slightly younger than RA patients ( $53.46 \pm 9.69$  vs.  $58.51 \pm 13.13$ ;  $p < 0.001$ ). Seventy-eight percent of RA patients were female,

**Table 2.** Demographic and clinical characteristics of RA patients.

	RA patients		
	Overall (n = 458)	Women (n = 360)	Men (n = 98)
<b>Demographic characteristics</b>			
Age (years)	58.51 ± 13.13	57.94 ± 13.02	60.56 ± 13.39
<b>Clinical assessment</b>			
Disease duration (years)	12.39 ± 7.62	12.64 ± 7.84	11.43 ± 6.61
Percentage of patients with RF positivity	71.20	70.26	74.72
Percentage of patients with positive anti-CCP *	70.70	71.65	66.67
Current DAS28 (average)	3.31	3.42	2.89
<b>Treatments</b>			
<b>DMARDs</b>			
Methotrexate (%)	259 (56.55)	207 (57.50)	52 (53.06)
Leflunomide (%)	178 (38.86)	132 (36.67)	46 (46.94)
Sulphasalazine (%)	40 (8.73)	31 (8.61)	9 (9.18)
<b>Biologic agents</b>			
Infliximab (%)	171 (37.34)	141 (39.17)	30 (30.61)
Etanercept (%)	140 (30.57)	116 (32.22)	24 (24.49)
Adalimumab (%)	124 (27.07)	102 (28.33)	22 (22.45)
Abatacept (%)	43 (9.39)	35 (9.72)	8 (8.16)
Rituximab (%)	112 (24.45)	91 (25.28)	21 (21.42)
Tocilizumab (%)	20 (4.37)	18 (5.00)	2 (2.04)
Others (%)	7 (1.52)	6 (1.67)	1 (1.02)
<b>Number of biologic agents</b>			
0	114 (24.89)	76 (21.11)	38 (38.77)
1	195 (42.58)	162 (45.00)	33 (33.67)
2	71 (15.50)	56 (15.55)	15 (15.31)
3	46 (10.04)	40 (11.11)	6 (6.12)
4	20 (4.37)	17 (4.72)	3 (3.06)
>4	12 (2.62)	9 (2.50)	3 (3.06)

Data are means ± standard deviation. Abbreviations: RF, rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs.

\*Anti-CCP value was available only in 314 patients (254 women and 60 men).

doi:10.1371/journal.pone.0072732.t002

70.7% were positive for anti-CCP antibodies and 71.2% were positive for RF (rheumatoid factor). According to the DAS28, male patients showed low active disease (DAS28<sub>Male</sub> = 2.89) whereas women had moderately active disease (DAS28<sub>Female</sub> = 3.42). Women tended to have more often a DAS28 ≥ 3.2 compared to men (56.18% vs. 43.48%,  $p = 0.078$ ). The overall average disease duration was 12.39 years.

All analyzed SNPs were in HWE in the control group with the exception of *Dectin-1*<sub>rs16910631</sub> ( $p > 0.01$ ). Five SNPs showed overall association with RA (Table 3 and Table S1). Carriers of *Dectin-2*<sub>rs4264222T</sub> allele had an increased risk of RA (OR = 1.47, 95%CI 1.10–1.96,  $P = 0.009$ ) whereas patients harboring the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900T</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> alleles had a decreased risk of developing the disease (OR = 0.66, 95%CI 0.49–0.88,  $P = 0.004$ ; OR = 0.66, 95%CI 0.50–0.89,  $P = 0.006$ ; OR = 0.73, 95%CI 0.55–0.97,  $P = 0.03$  and OR = 0.68, 95%CI 0.51–0.91,  $P = 0.009$ ; Table 3). In addition, patients bearing the *Dectin-2*<sub>rs7134303G</sub> allele showed a trend to have an increased risk for RA (OR = 1.35, 95%CI 1.00–1.83). Most importantly, binary logistic regression analyses revealed gender-specific associations with RA for six SNPs (Table 3). There was a

significant effect modification by gender for *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> and *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> SNPs ( $P_{\text{interaction}} = 0.041$  and 0.011, respectively; Table 3). Women carrying either the *Dectin-2*<sub>rs4264222T</sub> or *Dectin-2*<sub>rs7134303G</sub> alleles had an increased risk of RA (OR = 1.93, 95%CI 1.34–2.79 and OR = 1.90, 95%CI 1.29–2.80). Additionally, women carrying the *MCP-1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900T</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> alleles had a decreased risk of RA compared with those carrying the wild-type genotype (OR = 0.61, 95%CI 0.43–0.87; OR = 0.67, 95%CI 0.47–0.95 and OR = 0.60, 95%CI 0.42–0.86). As also men had decreased, but statistically not significant ORs, no effect modification by gender was observed. A borderline gender-specific effect was observed for the *DC-SIGN*<sub>rs2287886</sub> SNP ( $P_{\text{interaction}} = 0.071$ ; Table 3). Here, male carriers of the *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> allele had an increased risk of RA (OR = 1.70, 95%CI 1.03–2.78). Additionally, the association of the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> with a decreased risk was stronger in men than in women (OR = 0.53, 95%CI 0.32–0.89 vs. OR = 0.73, 95%CI 0.51–1.04).

After correction for multiple testing using the SNP Spectral Decomposition Lite program (number of independent marker loci, 21;  $p = 0.05/21 = 0.002$ ), only the *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> and *Dectin-*



**Table 3.** Dectin-2, DC-SIGN and MCP-1 polymorphisms associated with rheumatoid arthritis.

Variant information	Overall (n = 970)				Men (n = 393)				Women (n = 577)				P interaction <sup>3</sup>
	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>1</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	
<b>DC-SIGN_rs2287886</b>													
G/G	242 (49.0)	199 (44.8)	1.00		141 (49.8)	38 (40.0)	1.00		101 (47.9)	161 (46.1)	1.00		
A/G	201 (40.7)	191 (43.0)	1.26 (0.93–1.70)		119 (42.0)	42 (44.2)	1.52 (0.90–2.57)		82 (38.9)	149 (42.7)	1.16 (0.80–1.69)		
A/A	51 (10.3)	54 (12.2)	1.20 (0.75–1.91)	0.32	23 (8.1)	15 (15.8)	<b>2.56 (1.16–5.63)</b>	<b>0.05</b>	28 (13.3)	39 (11.2)	0.83 (0.48–1.45)	0.47	0.071
G/G vs. A/G+A/A	252 (51.0)	245 (55.2)	1.24 (0.94–1.65)	0.13	142 (50.2)	57 (60.0)	<b>1.70 (1.03–2.78)</b>	<b>0.04</b>	110 (52.1)	188 (53.9)	1.08 (0.76–1.53)	0.67	
<b>DC-SIGN_rs4804803</b>													
A/A	270 (54.2)	285 (63.9)	1.00		153 (53.7)	66 (68.8)	1.00		117 (54.9)	219 (62.6)	1.00		
A/G	193 (38.8)	135 (30.3)	<b>0.64 (0.47–0.86)</b>		108 (37.9)	27 (28.1)	0.59 (0.34–1.01)		85 (39.9)	108 (30.9)	<b>0.67 (0.46–0.97)</b>		
G/G	35 (7.0)	26 (5.8)	0.79 (0.44–1.42)	<b>0.01</b>	24 (8.4)	3 (3.1)	0.29 (0.08–1.04)	<b>0.03</b>	11 (5.2)	23 (6.6)	1.23 (0.57–2.65)	0.07	0.149
A/A vs. A/G+G/G	228 (45.8)	161 (36.1)	<b>0.66 (0.49–0.88)</b>	<b>0.004</b>	132 (46.3)	30 (31.2)	<b>0.53 (0.32–0.89)</b>	<b>0.02</b>	96 (45.1)	131 (37.4)	0.73 (0.51–1.04)	0.08	
<b>Dectin-2_rs7134303</b>													
A/A	350 (69.9)	287 (64.9)	1.00		188 (65.7)	70 (72.9)	1.00		162 (75.3)	217 (62.7)	1.00		
A/G	136 (27.1)	138 (31.2)	1.34 (0.98–1.84)		88 (30.8)	23 (24.0)	0.72 (0.41–1.26)		48 (22.3)	115 (33.2)	<b>1.88 (1.26–2.81)</b>		
G/G	15 (3.0)	17 (3.8)	1.41 (0.65–3.09)	0.15	10 (3.5)	3 (3.1)	0.71 (0.18–2.83)	0.48	5 (2.3)	14 (4.0)	2.08 (0.72–5.97)	<b>0.004</b>	<b>0.011</b>
A/A vs. A/G+G/G	151 (30.1)	155 (35.1)	1.35 (1.00–1.83)	<b>0.05</b>	98 (34.3)	26 (27.1)	0.72 (0.42–1.23)	0.22	53 (24.6)	129 (37.3)	<b>1.90 (1.29–2.80)</b>	<b>0.004</b>	<b>9.00E-04</b>
<b>Dectin-2_rs4264222</b>													
C/C	324 (64.3)	254 (57.0)	1.00		173 (59.9)	60 (63.2)	1.00		151 (70.2)	194 (55.3)	1.00		
C/T	160 (31.8)	165 (37.0)	<b>1.44 (1.06–1.95)</b>		104 (36.0)	31 (32.6)	0.89 (0.53–1.50)		56 (26.1)	134 (38.2)	<b>1.90 (1.29–2.78)</b>		
T/T	20 (4.0)	27 (6.0)	1.67 (0.86–3.24)	<b>0.03</b>	12 (4.2)	4 (4.2)	1.03 (0.31–3.45)	0.91	8 (3.7)	23 (6.5)	2.19 (0.94–5.10)	<b>0.001</b>	<b>0.041</b>
C/C vs. C/T+T/T	180 (35.7)	192 (43.0)	<b>1.47 (1.10–1.96)</b>	<b>0.009</b>	116 (40.1)	35 (36.8)	0.91 (0.55–1.49)	0.70	64 (29.8)	157 (44.7)	<b>1.93 (1.34–2.79)</b>	<b>0.001</b>	<b>3.00E-04</b>
<b>MCP-1_rs1024611</b>													
A/A	260 (54.5)	275 (61.8)	1.00		160 (58.4)	60 (64.5)	1.00		100 (49.3)	215 (61.1)	1.00		
G/A	178 (37.3)	139 (31.2)	<b>0.64 (0.47–0.88)</b>		90 (32.9)	24 (25.8)	0.80 (0.46–1.42)		88 (43.4)	115 (32.7)	<b>0.60 (0.41–0.87)</b>		
G/G	39 (8.2)	31 (7.0)	0.76 (0.44–1.31)	<b>0.02</b>	24 (8.8)	9 (9.7)	0.82 (0.35–1.93)	0.71	15 (7.4)	22 (6.2)	0.68 (0.34–1.39)	<b>0.02</b>	0.692
A/A vs. G/A+G/G	217 (45.5)	170 (38.2)	<b>0.66 (0.50–0.89)</b>	<b>0.006</b>	114 (41.6)	33 (35.5)	0.81 (0.48–1.35)	0.41	103 (50.7)	137 (38.9)	<b>0.61 (0.43–0.87)</b>	<b>0.006</b>	
<b>MCP-1_rs13900</b>													
C/C	271 (54.6)	276 (60.9)	1.00		164 (56.9)	60 (61.2)	1.00		107 (51.4)	216 (60.9)	1.00		
C/T	190 (38.3)	151 (33.3)	<b>0.71 (0.53–0.96)</b>		101 (35.1)	29 (29.6)	0.87 (0.51–1.49)		89 (42.8)	122 (34.4)	<b>0.66 (0.46–0.95)</b>		
T/T	35 (7.1)	26 (5.7)	0.84 (0.47–1.49)	0.08	23 (8.0)	9 (9.2)	0.90 (0.38–2.12)	0.88	12 (5.8)	17 (4.8)	0.74 (0.34–1.63)	0.08	0.704
C/C vs. C/T+T/T	225 (45.4)	177 (39.1)	<b>0.73 (0.55–0.97)</b>	<b>0.03</b>	124 (43.1)	38 (38.8)	0.88 (0.54–1.44)	0.61	101 (48.6)	139 (39.1)	<b>0.67 (0.47–0.95)</b>	<b>0.03</b>	
<b>MCP-1_rs4586</b>													
T/T	191 (39.5)	209 (46.4)	1.00		121 (43.8)	47 (48.0)	1.00		70 (33.6)	162 (46.0)	1.00		
C/T	227 (46.9)	190 (42.2)	<b>0.68 (0.50–0.92)</b>		117 (42.4)	37 (37.8)	0.82 (0.49–1.39)		110 (52.9)	153 (43.5)	<b>0.61 (0.42–0.89)</b>		

Table 3. Cont.

Variant information	Overall (n = 970)			Men (n = 393)			Women (n = 577)			P interaction <sup>3</sup>		
	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>1</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)		Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>
C/C	66 (13.6)	51 (11.3)	0.69 (0.44–1.09)	<b>0.03</b>	38 (13.8)	14 (14.3)	0.98 (0.47–2.05)	0.75	28 (13.5)	37 (10.5)	<b>0.56 (0.31–0.99)</b>	<b>0.02</b>
T/T vs. C/T+ C/C	293 (60.5)	241 (53.6)	<b>0.68 (0.51–0.91)</b>	<b>0.009</b>	155 (56.2)	51 (52.0)	0.86 (0.53–1.40)	0.55	138 (66.3)	190 (54.0)	<b>0.60 (0.42–0.86)</b>	<b>0.005</b>

<sup>1</sup>Models adjusted for age and gender.

<sup>2</sup>Models adjusted for age.

<sup>3</sup>p value for testing of effect modification by gender was calculated utilizing an interaction term of gender and genetic polymorphism assuming a co-dominant model of inheritance.  $P < 0.05$  in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0072732.t003

$2_{rs7134303}$  associations in women retained significance ( $P = 3.00 \text{ E-}04$  and  $P = 9.00 \text{ E-}04$ ), whereas the associations with *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024611</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586</sub> showed borderline significance in the whole population ( $P = 0.004$ ,  $P = 0.006$  and  $P = 0.009$ ; Table 3).

In phase 2, in order to increase the statistical power of this study and to confirm the significant associations, we further genotyped the significant SNPs in 754 Caucasian RA patients (626 women and 128 men) and 519 healthy controls (348 women and 171 men). Clinical characteristics of the RA patient population are shown in Table S2 and characteristics of the pooled population are shown in Table S3. In the phase 2, RA patients had a similar age and showed slightly higher percentages of anti-CCP (77.72 vs. 70.70) and RF positivity (75.98 vs. 71.20). As before, male patients showed low active disease when compared to women (DAS28-Male = 3.21 vs. DAS28-Female = 3.78). Thus, we end up with a total population of 2,243 individuals including 1,212 RA patients (986 women and 226 men) and 1,031 controls (565 women and 466 men). After this recruitment the study had over 80% power (co-dominant model) to detect an odds ratio of 1.19 at  $\alpha = 0.008$  (multiple testing threshold) for a polymorphism with a minor allele frequency of 0.25. Although the gender-stratified analysis reduced the statistical power of the study, we still had power to detect reasonably small risks (OR<sub>WOMEN</sub> = 1.23 and OR<sub>MEN</sub> = 1.36).

Binary logistic regression analysis adjusted for age, gender and center in the pooled population showed that *MCP-1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900</sub>, *MCP-1*<sub>rs4586</sub> and *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub> polymorphisms were associated with a decreased risk of developing RA (OR = 0.76, 95%CI 0.61–0.95,  $P = 0.01$ ; OR = 0.77, 95%CI 0.62–0.96,  $P = 0.02$ ; OR = 0.80, 95%CI 0.64–0.99,  $P = 0.04$ ; and OR = 0.77, 95%CI 0.62–0.96,  $P = 0.02$ ; Table 4). Although there was no significant effect modification by gender, *Dectin-2* and *MCP-1* polymorphisms seemed to have a stronger effect in women compared to men, whereas variants within *DC-SIGN* showed more evident effects in men. Thus, women carrying the *Dectin-2*<sub>rs4264222T</sub> allele had an increased risk of RA (OR = 1.38, 95%CI 1.08–1.77,  $P = 0.01$ ) whereas women harbouring the *MCP-1*<sub>rs1024611G</sub> and *MCP-1*<sub>rs13900T</sub> alleles had a decreased risk of RA in comparison with those carrying the wild-type genotype (OR = 0.74, 95%CI 0.58–0.94,  $P = 0.02$  and OR = 0.76, 95%CI 0.59–0.97,  $P = 0.03$ ; Table 4). Women bearing the *Dectin-2*<sub>rs7134303G</sub> showed also a trend towards an increased risk of the disease (OR = 1.30, 95%CI 1.00–1.69,  $P = 0.05$ ) whereas those women carrying the *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> allele had a decreased risk for RA (OR = 0.78, 95%CI 0.61–1.00,  $P = 0.05$ ; Table 4). We could confirm that none of these effects was observed in men. We also confirmed that men carrying the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> allele had a decreased risk to develop RA (OR = 0.56, 95%CI 0.34–0.93,  $P = 0.02$ ; Table 4) whereas men harboring *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> allele had trend to have an increased risk of RA (OR = 1.54, 95%CI 0.96–2.46,  $P = 0.07$ ). None of these associations resisted multiple testing adjustments in the pooled sample (number of independent marker loci was estimated including only those SNPs genotyped in the pooled sample;  $p = 0.05/6 = 0.008$ ) and all require further replication in independent populations.

For predicting the effect of polymorphisms found associated with RA we used FastSNP, which predicts the possible effect of genetic variants on the protein function and/or structure. Among the SNPs associated either with increased or decreased risk of RA, 2 SNPs were predicted to have functional impact. The predictive functional analysis suggested an intronic enhancer function for *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> due to its location in a transcription factor-binding site (risk score 1–2) and a function as gene expression regulator for the *MCP-1*<sub>rs1024611</sub> (risk score 1–3). The presence of the *Dectin-*



**Table 4.** Overall analysis of Dectin-2, DC-SIGN and MCP-1 polymorphisms with rheumatoid arthritis.

Variant information	Overall (n = 2252)						Men (n = 692)						Women (n = 1560)					
	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>1</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	P interaction <sup>3</sup>	
<b>DC-SIGN_rs2287886</b>																		
G/G	460 (47.5)	534 (46.1)	1.00		209 (48.6)	90 (41.7)	1.00		251 (46.6)	444 (47.1)	1.00		211 (39.2)	391 (41.5)	1.16 (0.89–1.51)			
A/G	389 (40.2)	487 (42.1)	1.22 (0.97–1.53)		178 (41.4)	96 (44.4)	1.42 (0.86–2.35)		211 (39.2)	391 (41.5)	1.16 (0.89–1.51)		76 (14.1)	107 (11.4)	0.91 (0.63–1.33)	0.149		
A/A	119 (12.3)	137 (11.8)	1.10 (0.78–1.53)	0.25	43 (10.0)	30 (13.9)	1.98 (0.95–4.12)	0.14	76 (14.1)	107 (11.4)	0.91 (0.63–1.33)	0.36	287 (53.4)	497 (52.8)	1.09 (0.86–1.39)	0.47		
G/G vs. A/G+A/A	508 (52.5)	624 (53.9)	1.19 (0.96–1.47)	0.12	221 (51.4)	126 (58.3)	1.54 (0.96–2.46)	0.07	287 (53.4)	497 (52.8)	1.09 (0.86–1.39)	0.47						
<b>DC-SIGN_rs4804803</b>																		
A/A	557 (57.1)	730 (62)	1.00		244 (56.2)	142 (64.8)	1.00		313 (57.9)	588 (61.3)	1.00		195 (36)	304 (31.7)	0.77 (0.59–1.00)			
A/G	350 (35.9)	370 (31.4)	<b>0.74 (0.59–0.93)</b>		155 (35.7)	66 (30.1)	<b>0.58 (0.34–0.99)</b>		195 (36)	304 (31.7)	0.77 (0.59–1.00)		33 (6.1)	67 (7)	1.09 (0.65–1.81)	0.11		
G/G	68 (7)	78 (6.6)	0.93 (0.60–1.43)	<b>0.04</b>	35 (8.1)	11 (5)	0.48 (0.18–1.30)	0.07	33 (6.1)	67 (7)	1.09 (0.65–1.81)	0.11	228 (42.1)	371 (38.7)	0.81 (0.64–1.04)	0.10		
A/A vs. A/G+G/G	418 (42.9)	448 (38)	<b>0.77 (0.62–0.96)</b>	<b>0.02</b>	190 (43.8)	77 (35.2)	<b>0.56 (0.34–0.93)</b>	<b>0.02</b>	228 (42.1)	371 (38.7)	0.81 (0.64–1.04)	0.10						
<b>Dectin-2_rs17134303</b>																		
A/A	645 (68)	715 (62.3)	1.00		285 (66.3)	134 (64.1)	1.00		360 (69.4)	581 (61.9)	1.00		143 (27.6)	318 (33.9)	<b>1.32 (1.01–1.73)</b>			
A/G	269 (28.4)	385 (33.6)	1.15 (0.91–1.45)		126 (29.3)	67 (32.1)	0.68 (0.39–1.17)		143 (27.6)	318 (33.9)	<b>1.32 (1.01–1.73)</b>		16 (3.1)	39 (4.2)	1.15 (0.58–2.26)	0.13		
G/G	35 (3.7)	47 (4.1)	0.87 (0.49–1.54)	0.42	19 (4.4)	8 (3.8)	0.31 (0.08–1.29)	0.11	16 (3.1)	39 (4.2)	1.15 (0.58–2.26)	0.13	159 (30.6)	357 (38.1)	1.30 (1.00–1.69)	<b>0.05</b>		
A/A vs. A/G+G/G	304 (32)	432 (37.7)	1.11 (0.89–1.40)	0.36	145 (33.7)	75 (35.9)	0.62 (0.37–1.06)	0.08	159 (30.6)	357 (38.1)	1.30 (1.00–1.69)	<b>0.05</b>						
<b>Dectin-2_rs4264222</b>																		
C/C	623 (62.2)	647 (56.3)	1.00		272 (59.9)	121 (56.8)	1.00		351 (64.0)	526 (56.1)	1.00		169 (30.8)	353 (37.7)	<b>1.40 (1.08–1.82)</b>			
C/T	326 (32.5)	434 (37.7)	1.26 (1.00–1.58)		157 (34.6)	81 (38)	0.86 (0.52–1.42)		169 (30.8)	353 (37.7)	<b>1.40 (1.08–1.82)</b>		28 (5.1)	58 (6.2)	1.26 (0.74–2.16)	0.219		
T/T	53 (5.3)	69 (6.0)	1.11 (0.69–1.77)	0.14	25 (5.5)	11 (5.2)	0.79 (0.26–2.36)	0.80	28 (5.1)	58 (6.2)	1.26 (0.74–2.16)	<b>0.04</b>	197 (36.0)	411 (43.9)	<b>1.38 (1.08–1.77)</b>	<b>0.01</b>		
C/C vs. C/T+T/T	379 (37.8)	503 (43.7)	1.24 (1.00–1.53)	0.06	182 (40.1)	92 (43.2)	0.85 (0.52–1.38)	0.51	197 (36.0)	411 (43.9)	<b>1.38 (1.08–1.77)</b>	<b>0.01</b>						
<b>MCP-1_rs1024611</b>																		
A/A	522 (55.3)	672 (57.9)	1.00		245 (58.8)	126 (58.3)	1.00		277 (52.6)	546 (57.8)	1.00		217 (41.2)	335 (35.5)	<b>0.71 (0.55–0.92)</b>			
G/A	352 (37.3)	406 (35.0)	<b>0.73 (0.58–0.92)</b>		135 (32.4)	71 (32.9)	0.78 (0.45–1.36)		217 (41.2)	335 (35.5)	<b>0.71 (0.55–0.92)</b>		33 (6.3)	63 (6.7)	0.94 (0.56–1.56)	0.604		
G/G	70 (7.4)	82 (7.1)	0.94 (0.61–1.43)	<b>0.03</b>	37 (8.9)	19 (8.8)	0.89 (0.39–2.01)	0.68	33 (6.3)	63 (6.7)	0.94 (0.56–1.56)	<b>0.03</b>	250 (47.4)	398 (42.2)	<b>0.74 (0.58–0.94)</b>	<b>0.02</b>		
A/A vs. G/A+G/G	422 (44.7)	488 (42.1)	<b>0.76 (0.61–0.95)</b>	<b>0.01</b>	172 (41.2)	90 (41.7)	0.81 (0.49–1.33)	0.40	250 (47.4)	398 (42.2)	<b>0.74 (0.58–0.94)</b>	<b>0.02</b>						
<b>MCP-1_rs13900</b>																		
C/C	547 (55.4)	679 (57.7)	1.00		262 (58.5)	129 (58.6)	1.00		285 (52.9)	550 (57.5)	1.00		226 (41.9)	343 (35.9)	<b>0.73 (0.56–0.93)</b>			
C/T	379 (38.4)	416 (35.4)	<b>0.74 (0.59–0.93)</b>		153 (34.1)	73 (33.2)	0.81 (0.48–1.37)		226 (41.9)	343 (35.9)	<b>0.73 (0.56–0.93)</b>		28 (5.2)	63 (6.6)	1.02 (0.60–1.74)	0.774		
T/T	61 (6.2)	81 (6.9)	0.99 (0.64–1.54)	<b>0.03</b>	33 (7.4)	18 (8.2)	0.86 (0.37–2.03)	0.72	28 (5.2)	63 (6.6)	1.02 (0.60–1.74)	<b>0.04</b>	406 (42.5)	406 (42.5)	<b>0.76 (0.59–0.97)</b>	<b>0.03</b>		
C/C vs. C/T+T/T	440 (44.6)	497 (42.3)	<b>0.77 (0.62–0.96)</b>	<b>0.02</b>	186 (41.5)	91 (41.4)	0.82 (0.51–1.33)	0.43	254 (47.1)	406 (42.5)	<b>0.76 (0.59–0.97)</b>	<b>0.03</b>						
<b>MCP-1_rs4586</b>																		
T/T	396 (40.9)	498 (42.1)	1.00		195 (44.8)	94 (42.5)	1.00		201 (37.7)	404 (42.0)	1.00		274 (51.4)	433 (45.1)	<b>0.74 (0.57–0.96)</b>			
C/T	455 (47.0)	526 (44.5)	<b>0.74 (0.59–0.94)</b>		181 (41.6)	93 (42.1)	0.64 (0.38–1.09)		274 (51.4)	433 (45.1)	<b>0.74 (0.57–0.96)</b>							

Table 4. Cont.

Variant information	Overall (n = 2252)			Men (n = 692)			Women (n = 1560)						
	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>1</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	P interaction <sup>3</sup>
C/C	117 (12.1)	158 (13.4)	1.03 (0.73–1.45)	<b>0.02</b>	59 (13.6)	34 (15.4)	1.22 (0.61–2.43)	0.13	58 (10.9)	124 (12.9)	0.95 (0.63–1.43)	0.07	0.793
T/T vs. C/T+C/C	572 (59.1)	684 (57.9)	<b>0.80 (0.64–0.99)</b>	<b>0.04</b>	240 (55.2)	127 (57.5)	0.77 (0.48–1.24)	0.28	332 (62.3)	557 (58.0)	0.78 (0.61–1.00)	<b>0.05</b>	

<sup>1</sup>Models adjusted for age, gender and center.

<sup>2</sup>Models adjusted for age and center.

<sup>3</sup>p value for testing of effect modification by gender was calculated utilizing an interaction term of gender and genetic polymorphism assuming a co-dominant model of inheritance.  $P < 0.05$  in bold. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0072732.t004

$2_{rs7134303G}$  allele creates a nuclear protein-binding site for the transcription factor GATA-1 (GATA-binding factor 1) whereas the presence of the  $MCP-1_{rs1024611T}$  allele, which confers protection against RA, disrupts a binding site for both GATA-1 and GATA-2 in the promoter region of the MCP-1 gene. Whereas GATA-1 is a transcription factor expressed in circulating inflammatory monocytes and indispensable for effective DC maturation and survival, GATA-2 expression inhibits monocyte differentiation. These data suggest a central role of the  $Dectin-2_{rs7134303}$  and  $MCP-1_{rs1024611}$  polymorphisms in the gender-associated susceptibility to RA and point out a possible participation of GATA-1 and GATA-2 in the modulation of *Dectin-2* and *MCP-1* expression and, consequently, in the activation of both monocytes and DCs.

We also investigated the epistatic effect of the significant SNPs in order to find possible gender-specific high order interactions. A summary of the results for the models that had maximum testing accuracy and maximum cross validation consistency in women and men is presented in Table 5. In women, the overall best model consisted of  $Dectin-2_{rs4264222}$  and  $Dectin-2_{rs7134303}$  SNPs that interacted in a synergistic or non-additive manner. Logistic regression analysis applied to this two-locus model confirmed our results ( $P = 0.007$ ). In men, no SNP-SNP interactions were shown to be significant (Table 5).

Finally, we explored the effect of selected SNPs on disease activity and severity. No differences were found in relation to DAS28, the positivity for anti-CCP antibodies or RF when RA patients were grouped by gender and genotype (data not shown).

## Discussion

The idea that genetic factors have an impact on the predisposition to RA is well supported by our understanding of the disease biology and by data from a wide range of genetic epidemiologic studies [30–32]. This fact, along with studies showing sex-specific differences in incidence of RA and in immune response [10,33], suggests that genetic factors modulating the immune response may contribute to the sex-specific incidence rates. Considering this hypothesis, the present study was carried out to assess whether genetic variants within immune-related genes may differentially play a role in determining the risk of RA in women and men. Although to date there have been too few studies addressing the effect of gender on the risk of RA, some previous studies have reported female-specific associations between genetic variants in immune genes (TNF, TNFR2, IL4R and CD4) and risk of RA [23,34,35].

The present population-based case-control study included 2,243 individuals (1,212 RA patients and 1,031 controls) and confirmed the role of 4 SNPs within *Dectin-2*, *MCP-1* and *DC-SIGN* genes in determining the risk of RA. These results were in agreement with a previous study performed by Platinga *et al.* (2010), who reported no overall association of  $Dectin-1_{rs16910526}$  SNP with RA [36] but were in contrast with those results described by Dieguez-González *et al.* (2009) reporting no association of the  $DC-SIGN_{rs4804803}$  and RA [37]. These controversial results might be attributed to differences in population size and environmental factors but also confounding factors such as gender.

We also identified, for the first time, genetic variants in *Dectin-2*, *DC-SIGN* and *MCP-1* as contributing to the gender-specific risk for RA. Females with the  $Dectin-2_{rs4264222T}$  allele had an increased risk to develop RA whereas females carrying any of the  $MCP-1_{rs1024611G}$  and  $MCP-1_{rs13900T}$  alleles had a decreased risk to develop RA compared with carriers of the wild-type genotype. We also found that women bearing the  $Dectin-2_{rs7134303G}$  tended to



have an increased risk of the disease whereas those women carrying the *MCP-1*<sub>rs4586C</sub> allele showed a borderline significant decreased risk for RA. In males, none of these effects were found but carriers of the *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> had a significantly decreased risk of developing the disease whereas those harboring the *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> allele had trend to have an increased risk of RA. Although there was not significant effect modification by gender, *Dectin-2*, *MCP-1* and *DC-SIGN* polymorphisms showed consistent associations in women that were not seen in men and vice versa. Of note is that, after adjusting the significance level to account for multiple comparisons (study-wise significant *P*-threshold = 0.008), *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub>, *MCP-1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586</sub> SNPs showed both overall and gender-specific borderline significant associations. These results underlie the potential importance of analyzing RA data both with and without gender as a stratifying factor.

Gender-specific SNP-SNP interactions among the selected variants indicated that the combined effect of the polymorphisms with or without significant main effects conferred risk for RA. The MDR approach used in this study identified a two-locus significant model associated with high risk of RA in women while no significant models were found in men. In women, the strongest model for predicting RA risk was a model including *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> and *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> SNPs that interact in synergistic manner to increase the risk of RA. Although interesting, these results should be interpreted with caution given that the statistical modeling of SNP-SNP interactions may not be assumed as a true biological interaction. However, based on *in silico* tools, hypotheses concerning the molecular mechanisms resulting in differential activity of genes can be created. In this regard, these two SNPs (*Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> and *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub>) were found to be important in this study, both in the single SNP or the epistatic analysis. MDR analysis was further confirmed by logistic regression analysis. *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> creates an allele-specific change in transcriptional binding site for GATA-1 and could contribute, acting as intronic enhancer, to the transcriptional regulation of *Dectin-2* gene and, consequently, to affect its intracellular signaling and downstream gene expression.

According to these results, it is conceivable to suggest that *Dectin-2* variants, independently and/or through interactions may, at least partially, account for gender differences in susceptibility to RA. *Dectin-2*, a type II transmembrane receptor, is mainly expressed in DCs, macrophages and B-cells and its expression may be induced by inflammatory stimuli [38]. It is well known that *Dectin-2* recognizes carbohydrate motifs of self and non-self antigens. However, it has also been suggested that *Dectin-2* binds to endogenous ligands in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [39] and CD8<sup>+</sup> T-cells [40] thus triggering inflammatory responses. Most recently, *Dectin-2* has

been involved in promoting *Syk*- and *CARD9*-dependent *NFκB* activation [41], inducing the expression of a wide variety of pro-inflammatory mediators including cytokines, chemokines and co-stimulatory molecules and, thereby enhancing T-cell mediated immune responses. In line with this, Sato *et al.* also reported that, contrary to *Dectin-1* that binds *Syk* directly, *Dectin-2* couples to *Syk* through its association with Fc receptor gamma (*FcRγ*) chain leading to the activation of *NFκB* pathway and production of cytokines such as *TNF* and *IL1RA* [42]. Interestingly, it has also been described that *Dectin-2* is involved in the modulation of Th17 immune responses and that the production of *IL1β* and *IL23* upon *Dectin-2* requires *c-Rel*-dependent activation of *NFκB* [43]. These findings, along with those suggesting the role of CD4<sup>+</sup> T cells secreting *IL17* (Th17 cells) [44] and *NFκB* activation in the pathogenesis and/or progression of RA [45], may indicate a key role for *Dectin-2* in the exacerbation of the immune response that define the RA. Nonetheless, the molecular mechanisms by which the *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> and *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> polymorphisms might increase the risk for developing RA remain to be clarified. Based on the findings reported by Gutierrez *et al.* (2007) that demonstrate the expression of GATA-1 in circulating inflammatory monocytes and its role in the maturation and survival of DCs [46] and given our *in silico* predictions that the *Dectin-2*<sub>rs7134303\_G</sub> allele might create a binding site for this transcription factor, we might hypothesize that this SNP could regulate *Dectin-2* expression and, consequently, to promote *Dectin-2*-induced *NFκB* activation and production of cytokines such as *TNF* and *IL1RA*, the key molecules in the ethiopathogenesis of RA. However, we cannot rule out the possibility that *Dectin-2*<sub>rs7134303</sub> and *Dectin-2*<sub>rs4264222</sub> polymorphisms may be in linkage disequilibrium with unidentified susceptible variants that are responsible for the significant associations observed.

*MCP-1/CCL2* is a modulator of monocyte/macrophage recruitment to the site of inflammation and subsequent T-cell activation [8] that acts through the CC chemokine receptor 2 (*CCR2*) [47]. *MCP-1* is involved in the promotion of leukocyte infiltration during the inflammation process and it has been found highly expressed in the synovial fluid of RA patients [7]. Several polymorphisms have been identified in the gene encoding *MCP-1* and some of them have previously been studied in relation to RA susceptibility [48,49]. So far, most of these studies have been focused only on a potentially functional SNP, the *MCP-1*<sub>rs1024611</sub> (-2518A/G) [24,25], but no association with RA was found in Caucasian [48] or non-Caucasian populations [49,50]. Conversely to these studies, we found an overall protective effect of the *MCP-1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP-1*<sub>rs13900</sub> and *MCP-1*<sub>rs4586</sub> polymorphisms on the development of RA. However, given that the effect of these SNPs was restricted to women and given that these previous studies were

**Table 5.** MDR analysis to detect two-locus disease models.

Women	Gene	Model	TA	Sing test (P-value)	P-value*	CVC
1	<i>Dectin-2</i>	rs7134303	0.5402	3 (P = 0.95)	NS	9/10
2	<i>Dectin-2</i>	rs4264222, rs7134303	0.5560	8 (P = 0.05)	0.007	9/10
Men	Gene	Model	TA	Sing test (P-value)	P-value*	CVC
1	<i>DC-SIGN</i>	rs2287886	0.5424	9 (P = 0.01)	NS	10/10
2	<i>MCP-1, DC-SIGN</i>	rs13900, rs2287886	0.4738	5 (P = 0.62)	NS	3/10

TA, Testing accuracy; CVC, Cross-validation consistency. *P* < 0.05 was considered significant. NS, not significant.

\**P*-value for testing balanced accuracy using 1.000-fold permutation test (MDR permutation testing module vs. 0.49 alpha).

doi:10.1371/journal.pone.0072732.t005



based on a small population size, these studies might not have had sufficient statistical power to detect this association. Our predictive functional analysis also revealed that *MCP-1*<sub>rs1024611</sub> disrupts the binding site for GATA-1 and GATA-2, which support our hypothesis suggesting a central role of these transcription factors mediating monocyte and DC maturation by controlling *MCP-1* and *Dectin-2* expression.

Similarly to other case-control studies, this study has several potential limitations. First, the statistical power was limited when a gender-stratified analysis was performed. To overcome this problem, we reported dominant rather than only co-dominant model. This limitation has also to be considered when analyzing SNP-SNP interactions as the combined analysis reduced some genotype groups to a few individuals. Finally, another limitation of this study is that no *in vivo* mechanisms were clarified in relation to *Dectin-2*, *DC-SIGN* and *MCP-1* variants.

## Conclusions

In conclusion, this study represents a preliminary step to account for reported gender differences in RA incidence by demonstrating that genetic polymorphisms within immune-related genes may have different effects in women and men, hence determining the way their immune systems respond to autoimmune stimuli. Nonetheless, further studies using independent populations are warranted to validate our findings.

## Supporting Information

**Table S1 Genotype frequencies and risk estimates of polymorphic loci in genes related to the macrophage/dendritic cell-induced immune response.** <sup>1</sup>Models adjusted for age and gender. <sup>2</sup>Models adjusted for age. <sup>3</sup>*p* value for testing of effect modification by gender was calculated utilizing an interaction term of gender and genetic polymorphism assuming a co-dominant model of inheritance. Results in bold show *p*<0.05. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval. All

## References

- Scivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G (2007) The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1108: 312–322.
- Miossec P (2004) An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16: 218–222.
- Burmester GR, Stuhlmuller B, Keyser G, Kinne RW (1997) Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 40: 5–18.
- Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2: 189–202.
- Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, et al. (2009) Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- $\kappa$ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* 10: 203–213.
- van Lent PL, Figdor CG, Barrera P, van Ginkel K, Sloetjes A, et al. (2003) Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells. *Arthritis Rheum* 48: 360–369.
- Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, et al. (1993) Expression of monocyte chemoattractant and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum* 36: 762–771.
- Daly C, Rollins BJ (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* 10: 247–257.
- LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, et al. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8: 630–638.
- Myasoevoda E, Crowson CS, Kremers HM, Thorneau TM, Gabriel SE (2010) Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955–2007. *Arthritis Rheum* 62: 1576–1582.

analyzed SNPs were in HWE in the control group with the exception of *Dectin-1*<sub>rs16910631</sub> (*p*>0.01). This SNP was excluded from the analysis.

(DOCX)

**Table S2 Demographic and clinical characteristics of the RA population (Phase 2).** Data are means  $\pm$  standard deviation. Abbreviations: RF, rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs. \* Anti-CCP value was available only in 314 patients (254 women and 60 men).

(DOCX)

**Table S3 Demographic and clinical characteristics of the pooled population.** Data are means  $\pm$  standard deviation. Abbreviations: RF, rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs. † Rheumatoid factor and anti-CCP values were available for 1,100 (907 women and 193 men) and 709 patients (582 women and 127 men), respectively. \*Of those 1,212 RA patients (986 women and 226 men) were genotyped.

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank all participants who have agreed to participate in this study. Authors also thank Dr. Marta Alarcón Riquelme for her suggestions that substantially improved the manuscript and María Dolores Casares, Angeles Molina and Carmen Olóriz for sample collection and technical support.

## Author Contributions

Conceived and designed the study: RC AF KH JS. Responsible for genotyping: JS LC CBL. Did the statistical data analysis: JS MER. Coordinated the sample collection: HC AE IF JSC MAF AG LR AGU TV AG EPP EC JEF JS. Were involved in the records review and data acquisition: MJSP HC. Drafted the manuscript: RC AF KH JS.

23. Hussein YM, Mohamed RH, Pasha HF, El-Shahawy EE, Alzahrani SS (2011) Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients. *Cell Immunol* 271: 192–196.
24. Rovin BH, Lu L, Saxena R (1999) A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 344–348.
25. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, et al. (2005) CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 112: 1113–1120.
26. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhoo T, et al. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37: 507–513.
27. Stephens M, Scheet P (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76: 449–462.
28. Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, et al. (2006) FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 34: W635–641.
29. Moore JH (2004) Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 795–803.
30. Bowes J, Barton A (2008) Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 47: 399–402.
31. Worthington J (2005) Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 25 Suppl: 16–20.
32. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, et al. (2009) Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet* 41: 1313–1318.
33. Gabriel SE (2001) The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27: 269–281.
34. Hussein YM, El Tarhouny SA, Mohamed RH, El-Shal AS, Abul-Saoud AM, et al. (2011) Association of CD4 enhancer gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Rheumatol Int*.
35. Hussein Y, El-Tarhouny S, Mohamed R, Pasha H, Abul-Saoud A (2011) Association of interleukin-4 receptor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Joint Bone Spine*.
36. Plantinga TS, Fransen J, Takahashi N, Stienstra R, van Riel PL, et al. (2010) Functional consequences of DECTIN-1 early stop codon polymorphism Y238X in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R26.
37. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Gonzalez-Alvaro I, Fernandez-Gutierrez B, et al. (2009) Lack of association with rheumatoid arthritis of selected polymorphisms in 4 candidate genes: CFH, CD209, eotaxin-3, and MHC2TA. *J Rheumatol* 36: 1590–1595.
38. Taylor PR, Reid DM, Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S, et al. (2005) Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *Eur J Immunol* 35: 2163–2174.
39. Aragane Y, Maeda A, Schwarz A, Tezuka T, Ariizumi K, et al. (2003) Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance. *J Immunol* 171: 3801–3807.
40. Carter RW, Thompson C, Reid DM, Wong SY, Tough DF (2006) Induction of CD8+ T cell responses through targeting of antigen to Dectin-2. *Cell Immunol* 239: 87–91.
41. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, et al. (2009) Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 206: 2037–2051.
42. Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, et al. (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 281: 38854–38866.
43. Gringhuis SI, Wevers BA, Kaptein TM, van Capel TM, Theelen B, et al. (2011) Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2. *PLoS Pathog* 7: e1001259.
44. Miossec P (2007) Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum* 56: 2111–2115.
45. Makarov SS (2001) NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res* 3: 200–206.
46. Gutierrez L, Nikolic T, van Dijk TB, Hammad H, Vos N, et al. (2007) Gata1 regulates dendritic-cell development and survival. *Blood* 110: 1933–1941.
47. Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90: 909–928.
48. Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, et al. (2003) MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 64: 741–744.
49. Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, et al. (2003) Functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 and rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 32: 235–239.
50. Hwang SY, Cho ML, Park B, Kim JY, Kim YH, et al. (2002) Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Korean population and in Korean patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease. *Eur J Immunogenet* 29: 413–416.





**Table S1.** Genotype frequencies and risk estimates of polymorphic loci in genes related to the macrophage/dendritic cell-induced immune response.

Variant information	Overall						Men						Women						P interaction <sup>3</sup>
	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>1</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value	Control (%)	Cases (%)	OR (95% CI) <sup>2</sup>	P value			
<i>DC-SIGN_rs2287886</i>																			
G/G	242 (49.0)	199 (44.8)	1.00		141 (49.8)	38 (40.0)	1.00		101 (47.9)	161 (46.1)	1.00								
A/G	201 (40.7)	191 (43.0)	1.26 (0.93-1.70)		119 (42.0)	42 (44.2)	1.52 (0.90-2.57)		82 (38.9)	149 (42.7)	1.16 (0.80-1.69)								
A/A	51 (10.3)	54 (12.2)	1.20 (0.75-1.91)	0.32	23 (8.1)	15 (15.8)	<b>2.56 (1.16-5.63)</b>	<b>0.05</b>	28 (13.3)	39 (11.2)	0.83 (0.48-1.45)	0.47				0.071			
G/G vs. A/G+A/A	252 (51.0)	245 (55.2)	1.24 (0.94-1.65)	0.13	142 (50.2)	57 (60.0)	<b>1.70 (1.03-2.78)</b>	<b>0.04</b>	110 (52.1)	188 (53.9)	1.08 (0.76-1.53)	0.67							
<i>DC-SIGN_rs4804803</i>																			
A/A	270 (54.2)	285 (63.9)	1.00		153 (53.7)	66 (68.8)	1.00		117 (54.9)	219 (62.6)	1.00								
A/G	193 (38.8)	135 (30.3)	<b>0.64 (0.47-0.86)</b>		108 (37.9)	27 (28.1)	0.59 (0.34-1.01)		85 (39.9)	108 (30.9)	<b>0.67 (0.46-0.97)</b>								
G/G	35 (7.0)	26 (5.8)	0.79 (0.44-1.42)	<b>0.01</b>	24 (8.4)	3 (3.1)	0.29 (0.08-1.04)	<b>0.03</b>	11 (5.2)	23 (6.6)	1.23 (0.57-2.65)	0.07				0.149			
A/A vs. A/G+G/G	228 (45.8)	161 (36.1)	<b>0.66 (0.49-0.88)</b>	<b>0.004</b>	132 (46.3)	30 (31.2)	<b>0.53 (0.32-0.89)</b>	<b>0.02</b>	96 (45.1)	131 (37.4)	0.73 (0.51-1.04)	0.08							
<i>DC-SIGN_rs4804800</i>																			
A/A	383 (75)	351 (78.5)	1.00		215 (73.1)	75 (78.1)	1.00		168 (77.4)	276 (78.6)	1.00								
A/G	120 (23.5)	87 (19.5)	0.82 (0.59-1.16)		74 (25.2)	19 (19.8)	0.72 (0.40-1.31)		46 (21.2)	68 (19.4)	0.89 (0.58-1.36)								
G/G	8 (1.6)	9 (2)	1.40 (0.49-3.99)	0.42	5 (1.7)	2 (2.1)	1.15 (0.20-6.64)	0.54	3 (1.4)	7 (2)	1.54 (0.39-6.09)	0.69				0.854			
A/A vs. A/G+G/G	128 (25.1)	96 (21.5)	0.86 (0.62-1.20)	0.37	79 (26.9)	21 (21.9)	0.75 (0.42-1.33)	0.32	49 (22.6)	75 (21.4)	0.93 (0.61-1.40)	0.72							
<i>DC-SIGN_rs112310</i>																			
T/T	352 (71.1)	318 (70.7)	1.00		202 (71.1)	72 (74.2)	1.00		150 (71.1)	246 (69.7)	1.00								
A/T	126 (25.4)	114 (25.3)	1.02 (0.73-1.41)		70 (24.6)	23 (23.7)	1.05 (0.59-1.85)		56 (26.5)	91 (25.8)	1.02 (0.69-1.52)								
A/A	17 (3.4)	18 (4)	1.20 (0.57-2.52)	0.89	12 (4.2)	2 (2.1)	0.40 (0.08-1.90)	0.43	5 (2.4)	16 (4.5)	2.07 (0.73-5.88)	0.35				0.238			
T/T vs. A/T+A/A	143 (28.9)	132 (29.3)	1.04 (0.76-1.42)	0.81	82 (28.9)	25 (25.8)	0.93 (0.54-1.61)	0.80	61 (28.9)	107 (30.3)	1.11 (0.76-1.62)	0.60							
<i>DC-SIGN_rs10410342</i>																			
G/G	427 (87.7)	396 (86.8)	1.00		248 (87.6)	85 (86.7)	1.00		179 (87.8)	311 (86.9)	1.00								
C/G	60 (12.3)	55 (12.1)	0.99 (0.64-1.52)		35 (12.4)	12 (12.2)	0.89 (0.42-1.86)		25 (12.2)	43 (12.0)	1.01 (0.59-1.73)								
C/C	0 (0.0)	5 (1.1)	NA (0.00-NA)	<b>0.03</b>	0 (0.0)	1 (1.0)	NA (0.00-NA)	0.12	0 (0.0)	4 (1.1)	NA (0.00-NA)	0.16				0.979			
G/G vs. C/G+C/C	60 (12.3)	60 (13.2)	1.09 (0.71-1.66)	0.70	35 (12.4)	13 (13.3)	0.99 (0.48-2.03)	0.97	25 (12.2)	47 (13.1)	1.11 (0.66-1.89)	0.69							
<i>DC-SIGN_rs11465384</i>																			
C/C	405 (81.2)	377 (84.5)	1.00		233 (81.5)	85 (87.6)	1.00		172 (80.8)	292 (83.7)	1.00								
C/T	85 (17)	63 (14.1)	0.78 (0.53-1.14)		47 (16.4)	12 (12.4)	0.68 (0.34-1.39)		38 (17.8)	51 (14.6)	0.81 (0.51-1.30)								
T/T	9 (1.8)	6 (1.4)	0.64 (0.20-2.02)	0.34	6 (2.1)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	0.13	3 (1.4)	6 (1.7)	1.09 (0.27-4.43)	0.68				0.930			
C/C vs. C/T+T/T	94 (18.8)	69 (15.5)	0.76 (0.52-1.11)	0.15	53 (18.5)	12 (12.4)	0.61 (0.30-1.24)	0.16	41 (19.2)	57 (16.3)	0.83 (0.53-1.31)	0.43							

<i>DC-SIGN_rs11465413</i>										
T/T	406 (81.8)	356 (80.2)	1.00	233 (81.5)	76 (81.7)	1.00	173 (82.4)	280 (79.8)	1.00	
A/T	90 (18.1)	79 (17.8)	1.05 (0.73-1.53)	53 (18.5)	15 (16.1)	0.91 (0.47-1.77)	37 (17.6)	64 (18.2)	1.13 (0.71-1.78)	
A/A	0 (0)	9 (2)	NA (0.00-NA)	0 (0)	2 (2.1)	NA (0.00-NA)	0 (0)	7 (2)	NA (0.00-NA)	<b>0.02</b>
T/T vs. A/T+A/A	90 (18.1)	88 (19.8)	1.19 (0.83-1.71)	53 (18.5)	17 (18.3)	1.04 (0.55-1.98)	37 (17.6)	71 (20.2)	1.26 (0.80-1.97)	0.31
<i>DC-SIGN_rs7252229</i>										
G/G	353 (69.9)	315 (71)	1.00	202 (69.9)	71 (74)	1.00	151 (69.9)	244 (70.1)	1.00	
G/C	136 (26.9)	115 (25.9)	0.94 (0.69-1.30)	76 (26.3)	25 (26)	0.92 (0.52-1.60)	60 (27.8)	90 (25.9)	0.95 (0.64-1.40)	
C/C	16 (3.2)	14 (3.1)	0.97 (0.44-2.15)	11 (3.8)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	5 (2.3)	14 (4)	1.87 (0.65-5.35)	0.44
G/G vs. G/C+C/C	152 (30.1)	129 (29.1)	0.95 (0.70-1.29)	87 (30.1)	25 (26)	0.79 (0.46-1.37)	65 (30.1)	104 (29.9)	1.02 (0.70-1.48)	0.93
<i>DC-SIGN_rs7248637</i>										
G/G	390 (77.5)	361 (80.6)	1.00	222 (76.5)	77 (80.2)	1.00	168 (78.9)	284 (80.7)	1.00	
A/G	108 (21.5)	79 (17.6)	0.82 (0.58-1.18)	65 (22.4)	18 (18.8)	0.79 (0.43-1.45)	43 (20.2)	61 (17.3)	0.84 (0.54-1.31)	
A/A	5 (1)	8 (1.8)	1.49 (0.44-5.11)	3 (1)	1 (1)	0.82 (0.07-8.95)	2 (0.9)	7 (2)	1.97 (0.40-9.76)	0.49
G/G vs. A/G+A/A	113 (22.5)	87 (19.4)	0.86 (0.61-1.21)	68 (23.4)	19 (19.8)	0.79 (0.43-1.43)	45 (21.1)	68 (19.3)	0.89 (0.58-1.37)	0.61
<i>DC-SIGN_rs11465421</i>										
A/A	164 (33.4)	157 (35)	1.00	96 (33.9)	28 (29.2)	1.00	68 (32.7)	129 (36.5)	1.00	
A/C	239 (48.7)	215 (47.9)	1.00 (0.73-1.37)	139 (49.1)	52 (54.2)	1.31 (0.75-2.27)	100 (48.1)	163 (46.2)	0.86 (0.58-1.27)	
C/C	88 (17.9)	77 (17.1)	0.96 (0.64-1.45)	48 (17)	16 (16.7)	1.22 (0.58-2.57)	40 (19.2)	61 (17.3)	0.85 (0.51-1.40)	0.71
A/A vs. A/C+C/C	327 (66.6)	292 (65)	0.99 (0.73-1.33)	187 (66.1)	68 (70.8)	1.29 (0.76-2.18)	140 (67.3)	224 (63.5)	0.86 (0.59-1.24)	0.41
<i>Dectin-1_rs16910526</i>										
A/A	423 (85.1)	380 (84.1)	1.00	247 (85.5)	82 (86.3)	1.00	176 (84.6)	298 (83.5)	1.00	
A/C	66 (13.3)	65 (14.4)	1.09 (0.73-1.64)	37 (12.8)	13 (13.7)	0.98 (0.48-1.99)	29 (13.9)	52 (14.6)	1.12 (0.68-1.84)	
C/C	8 (1.6)	7 (1.6)	0.81 (0.26-2.52)	5 (1.7)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	3 (1.4)	7 (2)	1.33 (0.33-5.30)	0.85
A/A vs. A/C+C/C	74 (14.9)	72 (15.9)	1.06 (0.72-1.56)	42 (14.5)	13 (13.7)	0.87 (0.43-1.74)	32 (15.4)	59 (16.5)	1.14 (0.70-1.83)	0.60
<i>Dectin-1_rs7309123</i>										
C/C	172 (34.5)	146 (32.6)	1.00	106 (36.8)	34 (35.4)	1.00	66 (31.3)	112 (31.8)	1.00	
C/G	241 (48.3)	223 (49.8)	1.03 (0.75-1.41)	135 (46.9)	51 (53.1)	1.18 (0.70-1.99)	106 (50.2)	172 (48.9)	0.95 (0.64-1.41)	
G/G	86 (17.2)	79 (17.6)	1.01 (0.66-1.53)	47 (16.3)	11 (11.5)	0.78 (0.35-1.74)	39 (18.5)	68 (19.3)	1.09 (0.66-1.81)	0.84
C/C vs. C/G+G/G	327 (65.5)	302 (67.4)	1.02 (0.76-1.38)	182 (63.2)	62 (64.6)	1.08 (0.65-1.79)	145 (68.7)	240 (68.2)	0.99 (0.68-1.43)	0.94
<i>Dectin-1_rs3901533</i>										
G/G	301 (59.2)	263 (59.8)	1.00	176 (60.1)	61 (63.5)	1.00	125 (58.1)	202 (58.7)	1.00	

G/T	173 (34.1)	147 (33.4)	0.95 (0.70-1.28)	96 (32.8)	32 (33.3)	0.92 (0.55-1.55)	77 (35.8)	115 (33.4)	0.95 (0.65-1.37)
T/T	34 (6.7)	30 (6.8)	0.94 (0.54-1.66)	21 (7.2)	3 (3.1)	0.42 (0.12-1.49)	13 (6)	27 (7.8)	1.30 (0.64-2.64)
G/G vs. G/T+T/T	207 (40.8)	177 (40.2)	0.95 (0.71-1.26)	117 (39.9)	35 (36.5)	0.83 (0.50-1.37)	90 (41.9)	142 (41.3)	1.00 (0.70-1.42)
<i>Decim-1_rs4763446</i>									
T/T	357 (72.1)	318 (71)	1.00	204 (71.8)	71 (74)	1.00	153 (72.5)	247 (70.2)	1.00
C/T	128 (25.9)	117 (26.1)	0.96 (0.70-1.33)	74 (26.1)	21 (21.9)	0.77 (0.43-1.38)	54 (25.6)	96 (27.3)	1.07 (0.72-1.59)
C/C	10 (2)	13 (2.9)	1.77 (0.71-4.45)	6 (2.1)	4 (4.2)	2.53 (0.67-9.65)	4 (1.9)	9 (2.6)	1.44 (0.43-4.79)
T/T vs. C/T+C/C	138 (27.9)	130 (29)	1.01 (0.74-1.39)	80 (28.2)	25 (26)	0.88 (0.51-1.53)	58 (27.5)	105 (29.8)	1.10 (0.75-1.61)
<i>Decim-1_rs7311598</i>									
A/A	357 (72.6)	324 (71.7)	1.00	196 (69.8)	76 (77.5)	1.00	161 (76.3)	248 (70.1)	1.00
A/G	119 (24.2)	115 (25.4)	1.09 (0.78-1.51)	72 (25.6)	21 (21.4)	0.76 (0.42-1.36)	47 (22.3)	94 (26.6)	1.31 (0.87-1.97)
G/G	16 (3.2)	13 (2.9)	0.92 (0.39-2.13)	13 (4.6)	1 (1)	0.24 (0.03-1.91)	3 (1.4)	12 (3.4)	2.16 (0.60-7.85)
A/A vs. A/G+G/G	135 (27.4)	128 (28.3)	1.07 (0.78-1.46)	85 (30.2)	22 (22.4)	0.69 (0.39-1.20)	50 (23.7)	106 (29.9)	1.36 (0.92-2.03)
<i>Decim-2_rs7134303</i>									
A/A	350 (69.9)	287 (64.9)	1.00	188 (65.7)	70 (72.9)	1.00	162 (75.3)	217 (62.7)	1.00
A/G	136 (27.1)	138 (31.2)	1.34 (0.98-1.84)	88 (30.8)	23 (24.0)	0.72 (0.41-1.26)	48 (22.3)	115 (33.2)	<b>1.88 (1.26-2.81)</b>
G/G	15 (3.0)	17 (3.8)	1.41 (0.65-3.09)	10 (3.5)	3 (3.1)	0.71 (0.18-2.83)	5 (2.3)	14 (4.0)	2.08 (0.72-5.97)
A/A vs. A/G+G/G	151 (30.1)	155 (35.1)	1.35 (1.00-1.83)	98 (34.3)	26 (27.1)	0.72 (0.42-1.23)	53 (24.6)	129 (37.3)	<b>1.90 (1.29-2.80)</b>
<i>Decim-2_rs4264222</i>									
C/C	324 (64.3)	254 (57.0)	1.00	173 (59.9)	60 (63.2)	1.00	151 (70.2)	194 (55.3)	1.00
C/T	160 (31.8)	165 (37.0)	<b>1.44 (1.06-1.95)</b>	104 (36.0)	31 (32.6)	0.89 (0.53-1.50)	56 (26.1)	134 (38.2)	<b>1.90 (1.29-2.78)</b>
T/T	20 (4.0)	27 (6.0)	1.67 (0.86-3.24)	12 (4.2)	4 (4.2)	1.03 (0.31-3.45)	8 (3.7)	23 (6.5)	2.19 (0.94-5.10)
C/C vs. C/T+T/T	180 (35.7)	192 (43.0)	<b>1.47 (1.10-1.96)</b>	116 (40.1)	35 (36.8)	0.91 (0.55-1.49)	64 (29.8)	157 (44.7)	<b>1.93 (1.34-2.79)</b>
<i>Decim-2_rs4459385</i>									
C/C	274 (55.2)	264 (59.2)	1.00	162 (56.2)	58 (60.4)	1.00	112 (53.9)	206 (58.9)	1.00
C/T	183 (36.9)	149 (33.4)	0.81 (0.60-1.10)	106 (36.8)	30 (31.2)	0.90 (0.53-1.52)	77 (37)	119 (34)	0.81 (0.55-1.17)
T/T	39 (7.9)	33 (7.4)	0.83 (0.48-1.42)	20 (6.9)	8 (8.3)	1.10 (0.44-2.76)	19 (9.1)	25 (7.1)	0.71 (0.37-1.37)
C/C vs. C/T+T/T	222 (44.8)	182 (40.8)	0.82 (0.61-1.09)	126 (43.8)	38 (39.6)	0.93 (0.57-1.53)	96 (46.1)	144 (41.1)	0.79 (0.55-1.12)
<i>MCP-1_rs4586</i>									
T/T	191 (39.5)	209 (46.4)	1.00	121 (43.8)	47 (48.0)	1.00	70 (33.6)	162 (46.0)	1.00
C/T	227 (46.9)	190 (42.2)	<b>0.68 (0.50-0.92)</b>	117 (42.4)	37 (37.8)	0.82 (0.49-1.39)	110 (52.9)	153 (43.5)	<b>0.61 (0.42-0.89)</b>
C/C	66 (13.6)	51 (11.3)	0.69 (0.44-1.09)	38 (13.8)	14 (14.3)	0.98 (0.47-2.05)	28 (13.5)	37 (10.5)	<b>0.56 (0.31-0.99)</b>

T/T vs. C/T+C/C	293 (60.5)	241 (53.6)	<b>0.68 (0.51-0.91)</b>	<b>0.009</b>	155 (56.2)	51 (52.0)	0.86 (0.53-1.40)	0.55	138 (66.3)	190 (54.0)	<b>0.60 (0.42-0.86)</b>	<b>0.005</b>
<i>MCP-I_rs1024610</i>												
A/A	304 (61.2)	262 (58.6)	1.00		183 (63.8)	58 (62.4)	1.00		121 (57.6)	204 (57.6)	1.00	
T/A	158 (31.8)	157 (35.1)	0.99 (0.73-1.34)		82 (28.6)	30 (32.3)	1.02 (0.59-1.74)		76 (36.2)	127 (35.9)	0.97 (0.67-1.40)	
T/T	35 (7)	28 (6.3)	0.89 (0.50-1.58)	0.92	22 (7.7)	5 (5.4)	0.65 (0.23-1.83)	0.68	13 (6.2)	23 (6.5)	1.04 (0.50-2.14)	0.98
A/A vs. T/A+T/T	193 (38.8)	185 (41.4)	0.97 (0.73-1.30)	0.85	104 (36.2)	35 (37.6)	0.94 (0.56-1.55)	0.80	89 (42.4)	150 (42.4)	0.98 (0.69-1.39)	0.90
<i>MCP-I_rs1024611</i>												
A/A	260 (54.5)	275 (61.8)	1.00		160 (58.4)	60 (64.5)	1.00		100 (49.3)	215 (61.1)	1.00	
G/A	178 (37.3)	139 (31.2)	<b>0.64 (0.47-0.88)</b>		90 (32.9)	24 (25.8)	0.80 (0.46-1.42)		88 (43.4)	115 (32.7)	<b>0.60 (0.41-0.87)</b>	
G/G	39 (8.2)	31 (7.0)	0.76 (0.44-1.31)	<b>0.02</b>	24 (8.8)	9 (9.7)	0.82 (0.35-1.93)	0.71	15 (7.4)	22 (6.2)	0.68 (0.34-1.39)	<b>0.02</b>
A/A vs. G/A+G/G	217 (45.5)	170 (38.2)	<b>0.66 (0.50-0.89)</b>	<b>0.006</b>	114 (41.6)	33 (35.5)	0.81 (0.48-1.35)	0.41	103 (50.7)	137 (38.9)	<b>0.61 (0.43-0.87)</b>	<b>0.006</b>
<i>MCP-I_rs13900</i>												
C/C	271 (54.6)	276 (60.9)	1.00		164 (56.9)	60 (61.2)	1.00		107 (51.4)	216 (60.9)	1.00	
C/T	190 (38.3)	151 (33.3)	<b>0.71 (0.53-0.96)</b>		101 (35.1)	29 (29.6)	0.87 (0.51-1.49)		89 (42.8)	122 (34.4)	<b>0.66 (0.46-0.95)</b>	
T/T	35 (7.1)	26 (5.7)	0.84 (0.47-1.49)	0.08	23 (8.0)	9 (9.2)	0.90 (0.38-2.12)	0.88	12 (5.8)	17 (4.8)	0.74 (0.34-1.63)	0.08
C/C vs. C/T+T/T	225 (45.4)	177 (39.1)	<b>0.73 (0.55-0.97)</b>	<b>0.03</b>	124 (43.1)	38 (38.8)	0.88 (0.54-1.44)	0.61	101 (48.6)	139 (39.1)	<b>0.67 (0.47-0.95)</b>	<b>0.03</b>
<i>CCR2_rs3918358</i>												
A/A	247 (49.7)	214 (47.7)	1.00		145 (50.7)	44 (45.4)	1.00		102 (48.3)	170 (48.3)	1.00	
A/C	199 (40)	174 (38.8)	0.98 (0.72-1.32)		110 (38.5)	37 (38.1)	1.14 (0.68-1.93)		89 (42.2)	137 (38.9)	0.91 (0.63-1.32)	
C/C	51 (10.3)	61 (13.6)	1.50 (0.95-2.38)	0.17	31 (10.8)	16 (16.5)	1.89 (0.91-3.96)	0.25	20 (9.5)	45 (12.8)	1.34 (0.75-2.42)	0.44
A/A vs. A/C+C/C	250 (50.3)	235 (52.3)	1.08 (0.82-1.43)	0.59	141 (49.3)	53 (54.6)	1.30 (0.80-2.11)	0.29	109 (51.7)	182 (51.7)	0.99 (0.70-1.40)	0.96
<i>CCR2_rs743660</i>												
G/G	273 (56.2)	264 (58.5)	1.00		154 (55.6)	52 (54.2)	1.00		119 (56.9)	212 (59.7)	1.00	
A/G	177 (36.4)	147 (32.6)	0.89 (0.65-1.20)		102 (36.8)	32 (33.3)	0.92 (0.54-1.57)		75 (35.9)	115 (32.4)	0.87 (0.60-1.26)	
A/A	36 (7.4)	40 (8.9)	1.30 (0.76-2.20)	0.38	21 (7.6)	12 (12.5)	1.74 (0.76-3.97)	0.36	15 (7.2)	28 (7.9)	1.06 (0.54-2.09)	0.71
G/G vs. A/G+A/A	213 (43.8)	187 (41.5)	0.95 (0.72-1.27)	0.75	123 (44.4)	44 (45.8)	1.05 (0.65-1.72)	0.83	90 (43.1)	143 (40.3)	0.90 (0.63-1.28)	0.55
<i>CCR2_rs1799864</i>												
G/G	405 (81.3)	360 (80.9)	1.00		236 (82.2)	83 (87.4)	1.00		169 (80.1)	277 (79.1)	1.00	
A/G	84 (16.9)	77 (17.3)	0.86 (0.59-1.26)		47 (16.4)	11 (11.6)	0.57 (0.27-1.19)		37 (17.5)	66 (18.9)	1.02 (0.65-1.61)	
A/A	9 (1.8)	8 (1.8)	0.68 (0.24-1.91)	0.59	4 (1.4)	1 (1.1)	0.54 (0.05-5.66)	0.27	5 (2.4)	7 (2)	0.74 (0.23-2.38)	0.87
G/G vs. A/G+A/A	93 (18.7)	85 (19.1)	0.84 (0.59-1.21)	0.36	51 (17.8)	12 (12.6)	0.56 (0.28-1.15)	0.10	42 (19.9)	73 (20.9)	0.99 (0.64-1.53)	0.96



4 <sup>1</sup>Models adjusted for age and gender. <sup>2</sup>Models adjusted for age. <sup>3</sup>*p* value for testing of effect modification by gender was calculated utilizing an interaction term of gender and genetic  
5 polymorphism assuming a co-dominant model of inheritance. Results in bold show *p*<0.05. Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval. All analyzed SNPs were in HWE in  
6 the control group with the exception of *Dectin-1*<sub>rs16910631</sub> (*p*>0.01). This SNP was excluded from the analysis.  
7  
8  
9

**Table S2.** Demographic and clinical characteristics of the RA population (Phase 2).

	Overall (n=831)	RA patients	
		Women (n=699)	Men (n=132)
<i>Demographic characteristics</i>			
Age (years)	57.15 ± 12.85	56.67 ± 13.02	59.66 ± 11.66
<i>Clinical assessment</i>			
Percentage of patients with RF positivity	75.98	75.35	79.41
Percentage of patients with positive anti-CCP *	77.72	75.61	88.06
Current DAS28 (average)	3.69	3.78	3.21
<i>Treatments</i>			
<i>DMARDs</i>			
Methotrexate (%)	657 (79.06)	568 (81.26)	89 (67.42)
Leflunomide (%)	58 (6.98)	44 (6.29)	14 (10.61)
Sulphasalazine (%)	153 (18.41)	128 (18.31)	25 (18.94)
<i>Biologic agents</i>			
Infliximab (%)	237 (28.52)	201 (28.76)	36 (27.27)
Etanercept (%)	201 (24.19)	168 (24.03)	33 (25.00)
Adalimumab (%)	98 (11.79)	88 (12.59)	10 (7.58)
Abatacept (%)	12 (1.44)	11 (1.57)	1 (0.76)
Rituximab (%)	60 (7.22)	52 (7.44)	8 (6.06)
Tocilizumab (%)	53 (6.38)	45 (6.44)	8 (6.06)
Others (%)	26 (3.13)	24 (3.43)	2 (1.51)
<i>Number of biologic agents</i>			
0	341 (41.03)	287 (41.06)	54 (40.91)
1	353 (42.48)	290 (41.49)	63 (47.73)
2	94 (11.31)	82 (11.73)	12 (9.09)
3	30 (3.61)	28 (4.01)	2 (1.52)
4	10 (1.20)	10 (1.43)	0 (0.00)
>4	3 (0.36)	2 (0.29)	1 (0.76)

Data are means ± standard deviation. Abbreviations: RF, rheumatoid factor; Anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs. \* Anti-CCP value was available only in 314 patients (254 women and 60 men).

**Table S3.** Demographic and clinical characteristics of the pooled population.

	<i>RA patients</i>		
	<i>Overall (n=1289)*</i>	<i>Women (n=1059)</i>	<i>Men (n=230)</i>
<i>Demographic characteristics</i>			
Age (years)	57.64 ± 12.98	57.11 ± 13.04	60.07 ± 12.42
<i>Clinical assessment</i>			
Percentage of patients with RF positivity †	74.09	73.43	77.20
Percentage of patients with positive anti-CCP †	74.61	73.88	77.95
Current DAS28 (average)	3.57	3.66	3.09
<i>Treatments</i>			
<i>DMARDs</i>			
Methotrexate (%)	916 (71.06)	775 (73.18)	141 (61.30)
Leflunomide (%)	236 (18.31)	176 (16.62)	60 (26.09)
Sulphasalazine (%)	193 (14.97)	159 (15.01)	34 (14.78)
<i>Biologic agents</i>			
Infliximab (%)	408 (31.65)	342 (32.29)	66 (28.70)
Etanercept (%)	341 (26.45)	284 (26.82)	57 (24.78)
Adalimumab (%)	222 (17.22)	190 (17.94)	32 (13.91)
Abatacept (%)	55 (4.27)	46 (4.34)	9 (3.91)
Rituximab (%)	172 (13.34)	143 (13.50)	29 (12.61)
Tocilizumab (%)	73 (5.66)	63 (5.95)	10 (4.35)
Others (%)	33 (2.56)	30 (2.83)	3 (1.30)
<i>Number of biologic agents</i>			
0	455 (35.30)	363 (34.28)	92 (40.00)
1	548 (42.51)	452 (42.68)	96 (41.74)
2	165 (12.80)	138 (13.03)	27 (11.74)
3	76 (5.90)	68 (6.42)	8 (3.48)
4	30 (2.33)	27 (2.55)	3 (1.30)
>5	14 (1.09)	10 (0.94)	4 (1.74)

Data are means ± standard deviation. Abbreviations: RF, rheumatoid factor; Anti-CCP, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs. † Rheumatoid factor and anti-CCP values were available for 1,100 (907 women and 193 men) and 709 patients (582 women and 127 men), respectively. \* Of those 1,212 RA patients (986 women and 226 men) were genotyped.

# *Artículo segundo*

---



## ***Genetic variants within immune-modulating genes influence the risk of developing rheumatoid arthritis and anti-TNF $\alpha$ drug response: a two-stage case-control study***

---

***Introducción y objetivos:*** La AR es una enfermedad autoinmune crónica que se desencadena como consecuencia de la interacción entre factores ambientales y genéticos. Un número creciente de estudios además sugieren que la presencia de ciertos polimorfismos en genes moduladores de la respuesta inmune (inmunomoduladores) puede afectar al riesgo a desarrollar la enfermedad e incluso al grado con el que los pacientes responden al tratamiento. Considerando estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar si 49 variantes genéticas en los genes *IL4*, *IL4R*, *IL5*, *IL8*, *IL8RA*, *IL8RB*, *IL10*, *IL10RA*, *IL12A*, *IL12B*, *IL13*, *IL16*, *IFNG*, *IFNGR2*, *CCR5*, *MIF* y *VEGFA* influían sobre el riesgo de AR y si podían además afectar a la respuesta terapéutica con fármacos anti-TNF (infliximab, adalimumab y etanercept). Dado que algunos de los polimorfismos seleccionados ha sido estudiado con anterioridad en el contexto de la AR, cuando fue posible realizamos meta-análisis de nuestros datos con los previamente publicados.

***Materiales y métodos:*** Realizamos un estudio de casos y controles de dos fases donde se genotiparon con sondas KASPar® (LGC Genomics) los 49 polimorfismos seleccionados en un total de 1239 pacientes de AR y 1229 controles sanos de origen caucásico. El efecto de los polimorfismos sobre el riesgo de AR y la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$  se evaluó mediante análisis de regresión logística ajustados por edad, sexo y centro de origen. El grado de respuesta terapéutica se definió de acuerdo a los criterios previamente establecidos por la liga europea EULAR. Los resultados se expresaron en OR y un IC del 95% y la significación estadística se estableció en  $P=0,0013$  tras la corrección por múltiples comparaciones de acuerdo al método descrito por Li y colaboradores en 2005. Además, realizamos estudios de interacción SNP-SNP mediante el software *multifactor dimensionality reduction* y estudios de meta-análisis con los resultados previamente publicados para los SNPs considerados de interés.

***Resultados:*** Nuestros datos mostraron que los portadores de los alelos *IL4R*<sub>rs2070874T</sub>, *IL4R*<sub>rs2243250T</sub> y *IL8RB*<sub>rs1126580A</sub> o del genotipo *IL8RB*<sub>rs2230054C/C</sub> presentaban un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR que los que portaban los genotipos o alelos más comunes (OR=1,37, IC 95% 1,13–1,67,  $P=0,0016$ ; OR=1,24, IC 95% 1,03–1,49,  $P=0,020$ ; OR=1,23, IC 95% 1,08–1,41,  $P=0,002$  y OR=1,19, IC 95% 1,04–1,36,  $P=0,01$ , respectivamente). La asociación de las variantes de *IL4* con un mayor riesgo de desarrollar AR se confirmó mediante la realización de un meta-análisis con datos previamente publicados que incluyó un total de 7150 individuos ( $P=0,0010$ ). Por otra parte, los análisis de interacción entre SNPs con MDR revelaron además la existencia de dos modelos de interacción compuestos que incluían variantes del gen *IL8RB* que actuaban sinérgicamente para incrementar el riesgo a desarrollar la enfermedad ( $P=0,014$  y  $P=0,018$ ). La existencia de dichos modelos se validó mediante análisis de regresión logística y confirmó la relevancia de los resultados obtenidos en el análisis individual de los polimorfismos. Finalmente, cuando evaluamos la asociación de los SNPs seleccionados con la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$ , observamos que los pacientes portadores del alelo *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> presentaban una respuesta terapéutica significativamente mejor que aquellos que portaban el genotipo T/T de referencia (OR=0,50, IC 95% 0,30–0,83,  $P=0,0075$  y OR-por alelo=0.57, IC 95% 0,38–0,86,  $P=0,0058$ ).

***Conclusiones:*** Nuestros resultados sugieren que la presencia de variantes genéticas en los genes *IL4* e *IL8RB* influye sobre el riesgo a desarrollar AR y que un polimorfismo en la región promotora del gen *IFNG* puede modular la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ .



# Genetic variants within immune-modulating genes influence the risk of developing rheumatoid arthritis and anti-TNF drug response: a two-stage case-control study

Luz M. Canet<sup>a,\*</sup>, Rafael Cáliz<sup>c,\*</sup>, Carmen B. Lupiañez<sup>a</sup>, Helena Canhão<sup>g,h</sup>, Manuel Martínez<sup>b</sup>, Alejandro Escudero<sup>e</sup>, Ileana Filipescu<sup>i</sup>, Juana Segura-Catena<sup>a</sup>, María J. Soto-Pino<sup>c</sup>, Miguel A. Ferrer<sup>c</sup>, Antonio García<sup>c</sup>, Lurdes Romani<sup>c</sup>, Eva Pérez-Pampin<sup>f</sup>, Alfonso González-Utrilla<sup>c</sup>, Miguel Ángel López Nevot<sup>d</sup>, Eduardo Collantes<sup>e</sup>, João E. Fonseca<sup>g,h</sup> and Juan Sainz<sup>a</sup>

**Background** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that arises as a result of the interaction between genetic and environmental factors. A growing body of research suggests that genetic variants within immune-related genes can influence the risk of developing the disease and affect drug response.

**Materials and methods** To test this hypothesis, we carried out a comprehensive two-stage case-control study in a White population of 1239 White RA patients and 1229 healthy controls to investigate whether 49 single nucleotide polymorphisms within or near 17 immune-related genes modulate the risk of developing RA and antitumor necrosis factor (anti-TNF) drug response.

**Results** Logistic regression analyses showed that carriers of the *IL4*<sub>rs2070874T</sub> and *IL4*<sub>rs2243250T</sub> and *IL8RB*<sub>rs1126580A</sub> alleles or the *IL8RB*<sub>rs2230054C/C</sub> genotype had a significantly increased risk of developing RA [odds ratio (OR) = 1.37, 95% confidence interval (CI) 1.13–1.67, *P* = 0.0016; OR = 1.24, 95% CI 1.03–1.49, *P* = 0.020; OR = 1.23, 95% CI 1.08–1.41, *P* = 0.002 and OR = 1.19, 95% CI 1.04–1.36, *P* = 0.01, respectively]. The association of the *IL4* variants was further supported by a meta-analysis including 7150 individuals (*P* = 0.0010), whereas the involvement of the *IL8RB* locus in determining the susceptibility to RA was also supported by gene-gene interaction analyses that identified significant two-locus and three-locus interaction models including *IL8RB* variants that act synergistically to increase the risk of the disease (*P* = 0.014 and 0.018). Interestingly, we also

found that patients harbouring the *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> allele showed a significantly better response to anti-TNF drugs than those patients carrying the wild-type allele (*P* = 0.0075).

**Conclusions** Our data suggest that *IL4* and *IL8RB* loci may have a small-effect genetic impact on the risk of developing RA, whereas *IFNG* might be involved in modulating the response to anti-TNF drugs. *Pharmacogenetics and Genomics* 00:000–000 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

*Pharmacogenetics and Genomics* 2015, 00:000–000

**Keywords:** drug response, genetic variants, *IL4*, *IL8RB*, *IFNG*, rheumatoid arthritis, susceptibility

<sup>a</sup>Genomic Oncology Area, <sup>b</sup>Area of Genomic Medicine, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Departments of <sup>c</sup>Rheumatology, <sup>d</sup>Immunology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, <sup>e</sup>Department of Rheumatology, Reina Sofía Hospital/Maimónides Institut for Biomedical Research of Córdoba/MIBIC/University of Córdoba, Córdoba, <sup>f</sup>Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, <sup>g</sup>Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, <sup>h</sup>Department of Rheumatology, Santa Maria Hospital-CHLN, Lisbon, Portugal and <sup>i</sup>Department of Rheumatology, University of Medicine and Pharmacy 'Iuliu Hatieganu', Cluj-Napoca, Romania

Correspondence to Juan Sainz, PhD, Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. de la Ilustración, 114, 18016 Granada, Spain  
Tel: +34 958 715500; fax: +34 958 637071; e-mail: juan.sainz@genyo.es

\*Luz M. Canet and Rafael Cáliz contributed equally to the writing of this article.

Received 21 October 2014 Accepted 27 May 2015

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common and complex autoimmune disease characterized by a systemic inflammatory process that mainly affects joints but that can eventually spread to other organs, leading to severe

disability and premature mortality [1]. Although many aspects of RA pathogenesis remain unknown, it is widely accepted that RA onset and even response to treatments are determined by the interaction between genetic variations and environmental factors [2]. Genome-wide and candidate gene association studies have shown that the dysregulation of the immune responses and the imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines underlying RA are, at least in part, influenced

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website ([www.pharmacogeneticsandgenomics.com](http://www.pharmacogeneticsandgenomics.com)).

1744-6872 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/FPC.0000000000000155

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.



by single nucleotide polymorphisms (SNPs) within immune-modulating genes [3–15]. Genetic variants in these genes have also been implicated in disease severity [16–21] and even in the level of response to different drugs [22,23]. However, despite the strong epidemiologic and experimental evidences, so far, only a relatively low number of risk markers associated with these biological processes have been undoubtedly identified and subsequently replicated [12].

On the basis of the above background, we sought to carry out a comprehensive two-stage case–control association study to assess whether 49 genetic variants within or near 17 immune-modulating genes (*IL4*, *IL4R*, *IL5*, *IL8*, *IL8RA*, *IL8RB*, *IL10*, *IL10RA*, *IL12A*, *IL12B*, *IL13*, *IL16*, *IFNG*, *IFNGR2*, *CCR5*, *MIF* and *VEGFA*) were associated with the risk of developing RA. Given that some of these SNPs were studied previously in RA, we also aimed to carry out meta-analyses to further confirm the role of these polymorphisms in determining the susceptibility to RA. Finally, we also evaluated the impact of selected SNPs on anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) drug response.

## Materials and methods

### Study population

In stage 1, all participants were White and recruited at the department of Rheumatology of the Virgen de las Nieves (Granada, Spain) and Reina Sofia (Córdoba, Spain) hospitals from January 2004 to January 2010. The population included 371 RA patients and 689 controls. The diagnosis of RA fulfilled the 1987 American College of Rheumatology (ACR) [24] ACR/EULAR classification criteria [25]. Controls were blood donor individuals recruited randomly at the Regional Blood Transfusion Centre (Granada-Almeria, Spain).

In stage 2, we extended the study by recruiting additional White RA cases ( $n=926$ ) and controls ( $n=548$ ) from our own institution as well as from other collaborating institutions. Seven hundred and seventy-three RA patients and 201 controls were recruited from the Santa Maria Hospital-CHLN (Biosanco-IMM, Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal). Ninety-five RA patients and 105 healthy controls were recruited from the Rheumatology Clinic of the University and Pharmacy ‘Iuliu Hatieganu’ Cluj-Napoca (Romania). Also, 58 additional RA patients were recruited from the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spain) and 242 healthy controls from Virgen de las Nieves University hospital (Granada, Spain). Thirty-four non-White individuals were excluded from the statistical analyses (32 RA patients and two controls) and 32 additional individuals (26 RA patients and six controls) were also excluded for technical reasons. One thousand and two hundred and thirty-nine RA patients and 1229 controls were finally available for genotyping. Additional information on the recruitment of

controls is shown as Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/A858>. All participants provided their written informed consent to participate in the study, which was approved by the respective ethical review committee of participant institutions.

### SNP selection and genotyping

SNPs were genotyped using KASPar assays (LGC Genomics, London, UK) as reported previously [26]. SNPs were selected because of their potential functionality, their involvement in determining the immune response and/or their association in previous studies with the risk of developing immune-related diseases (Table 1). For internal quality control, ~5% of samples were included as duplicates.

### Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium was assessed in the control group using a  $\chi^2$ -test. Logistic regression was used to assess the main effects of the SNPs on the risk of RA using the control group as the reference category. Statistical power was estimated using Quanto software (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). All tests were performed using the statistical software SSPS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). To account for multiple testing and reduce the rate of false positives, we calculated an adjusted significance level using the  $M_{\text{eff}}$  method [27]. We estimated an individual  $M_{\text{eff}}$  value for each gene considering the effective number of independent variables and the study-wide  $M_{\text{eff}}$  value was estimated by adding up the independent gene  $M_{\text{eff}}$  values using the SNP Spectral Decomposition Lite program (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpDsuperlite/>) [27]. Considering the resulting number of independent marker loci ( $M_{\text{eff},i}=39$ ) and the models of inheritance tested (codominant, dominant, recessive, and log-additive), the study-wide significance threshold to maintain a type I error rate at 5% was  $0.00032 [(0.05/39=0.0013)/4]$ .

### Haplotype analysis

SNPtool [28] and SNPstats [29] were used to reconstruct linkage disequilibrium (LD) blocks and to calculate haplotype association statistics. Block structures were determined according to the method of Gabriel *et al.* [30] and were graphically displayed using  $r^2$  values.

### Meta-analysis

We also carried out a meta-analysis with the previously reported results using DRAP (database of RA-related polymorphisms). The selection criteria for publications were as follows: (a) case–control study in White; (b) study reporting genotype frequencies, odds ratio (OR), and  $P$ -values; and (c) RA as outcome. We excluded those studies with no publically available data. We pooled the ORs for significant SNPs assuming a fixed-effect model. Coefficients with a  $P$ -value up to 0.05 were considered significant.



Table 1 Selected SNPs within immunomodulating genes

Gene name	Gene symbol_SNP	dbSNP rs#	Nucleotide substitution	Aa change/location	Reported associations with autoimmune diseases and/or reported functionality	References
Interleukin 4	IL4_ -1098	rs2243248	G/T	Promoter	Unknown	Scivo and colleagues [1–5]
Interleukin 4 receptor	IL4_ -589	rs2243250	C/T	Promoter	Associated with an overproduction of IL4. Associated with susceptibility to RA and its progression	Wallis and colleagues [6,7]
	IL4_ Ex1 -168	rs2070874	C/T	5'-UTR	Unknown	
	IL4R_ -29429 (-3223)	rs2057768	A/G	Promoter	Associated with soluble IL4R protein levels and with susceptibility to asthma	
	IL4R_ -28120 (-1914)	rs2107356	A/G	Promoter	Unknown	
Interleukin 5	IL4R_ Ex11 +300	rs1805011	A/C	E400A	Associated with RA progression and joint damage	Song <i>et al.</i> [8]
	IL4R_ Ex11 +828(-1902)	rs1801275	A/G	Q576R	Affect the binding and phosphorylation of the intracellular substrates STAT6 and IRS	
	IL5_ -746	rs2069812	C/T	Promoter	Associated with susceptibility to RA and with a decreased risk of erosive disease	
Interleukin 8	IL8_ -251	rs4073	A/T	Promoter	Associated with Grave's disease	Eyre <i>et al.</i> [12]
	IL8_ IVS1 -204 (+781)	rs2227306	C/T	Intronic	Associated with increased risk of IBD and asthma	
Interleukin 8 receptor alpha	IL8_ IVS1 +230 (+396)	rs2227307	G/T	Intronic	Associated with early onset of RA	Okada <i>et al.</i> [15]
	IL8RA_ Ex2 +860	rs2234671	G/C	S276T	Unknown	
	IL8RB_ Ex3 +785	rs2230054	C/T	L262L	Unknown	
	IL8RB_ Ex3 +1235	rs1126579	C/T	3'-UTR	Unknown	
	IL8RB_ Ex3-1010	rs1126580	A/G	3'-UTR	Unknown	
	IL10_ -1082	rs1800896	A/G	Promoter	Associated with a reduced risk of RA and with a favourable clinical outcome after prednisone therapy. Associated with antibody production	
Interleukin 10	IL10_ -819	rs1800871	C/T	Promoter	Associated with susceptibility to RA and antibody production	Hussein and colleagues [5,16–20]
	IL10_ -592	rs1800872	A/C	Promoter	Associated with RA and antibody production	
Interleukin 10 receptor alpha	IL10_ IVS1 -286	rs3024491	G/T	Intronic	Unknown	Hussein and colleagues [17,19–22]
	IL10_ Ex5 +210	rs3024496	C/T	3'-UTR	Unknown	
	IL10_ IVS3 -58	rs3024509	C/T	Intronic	Unknown	
	IL10RA_ Ex7 -109	rs9610	A/G	3'-UTR	Unknown	
Interleukin 12 alpha	IL12A_ IVS2 -798	rs582054	A/T	Intronic	Unknown	Vasilopoulos <i>et al.</i> [23]
	IL12A_ Ex7 +277	rs568408	A/G	3'-UTR	Unknown	
	IL12B_ Ex8 +159 (+1188)	rs3212227	A/C	3'-UTR	Associated with susceptibility to PsA	
Interleukin 12 beta	IL13_ -1069	rs1800925	C/T	Promoter	It alters the expression of IL13 and the binding of nuclear factors to the IL13 promoter. Associated with susceptibility to PsA	Arnett and colleagues [24–26]
	IL13_ Ex4 +98	rs20541	C/T	R144Q	Associated with IL13 activity and levels. Associated with asthma and PsA	
Interleukin 16	IL13_ IVS3 -24	rs1295686	A/G	Intronic	Unknown	Caliz and colleagues [26–28]
	IL16_ Ex22 +871	rs859	A/G	3'-UTR	Unknown	
	IL16_ Ex22 +889	rs11325	G/T	3'-UTR	Predicted to modify a binding site for miR-140	
Interferon gamma	INFG_ -1 615	rs2069705	C/T	Promoter	Unknown	Sole <i>et al.</i> [29]
	INFG_ IVS3 +284 (+2109)	rs1861494	C/T	Intronic	Associated with asthma and INFG levels	
Interferon gamma receptor 2	INFG2_ Ex7 -128	rs1059293	C/T	3'-UTR	Unknown	Gabriel <i>et al.</i> [30]
	INFG2_ Ex2 -16	rs9808753	A/G	Q64R	Associated with increased risk of JRA	
C-C chemokine receptor type 5	CCR5_ IVS1 +246	rs1799987	A/G	Intronic	Unknown	Marinou and colleagues [20,31–34]
	CCR5_ IVS1 +151	rs2734648	G/T	Intronic	Unknown	
Macrophage migration inhibitory factor	MIF_ -173	rs755622	C/G	Promoter	Unknown	

Table 1 (continued)

Gene name	Gene symbol_SNP	dbSNP rs#	Nucleotide substitution	Aa change/location	Reported associations with autoimmune diseases and/or reported functionality	References
Vascular endothelial growth factor alpha	VEGFA_ - 2578	rs699947	A/C	Promoter	Associated with increased risk of RA predisposition mainly in early-onset patients. Associated with an increased risk of joint damage. Associated with release of PsA after intra-articular steroid injection	Jiang and colleagues [35,36]
	VEGFA_ - 7	rs25648	C/T	5'-UTR	Associated with myocardial infarction in RA and with a smoking-dependent effect on VEGFA levels	
	VEGFA_IVS2 + 1378	rs3024994	C/T	Intronic	Predicted to alter VEGFA mRNA levels	
	VEGFA_IVS7 - 919	rs3025035	C/T	Intronic	Unknown	
	VEGFA_ 6112	rs2146323	A/C	Intronic	Unknown	
	VEGFA_IVS - 99	rs3024997	A/G	Intronic	Unknown	
	VEGFA_IVS7 + 763	rs3025030	C/G	Intronic	Associated with RA (haplotype)	
	VEGFA_ 5530	rs998584	G/T	Downstream	Unknown	
	VEGFA_ 1612	rs10434	A/G	3'-UTR	Unknown	
	VEGFA_ 5958bp 3' of STP	rs6899540	A/C	Downstream	Unknown	
	VEGFA_ 6119bp 3' of STP	rs6900017	C/T	Downstream	Unknown	
	VEGFA_ 6507bp 3' of STP	rs6905288	A/G	Downstream	Unknown	
						Cantagrel <i>et al.</i> [37]

References included in this table are listed in the supplementary material.

IBD, inflammatory bowel disease; JRA, juvenile rheumatoid arthritis; MI, myocardial infarction; PsA, psoriatic arthritis; RA, rheumatoid arthritis; SNP, single nucleotide polymorphisms; UTR, untranslated region.

**SNP-SNP interaction analysis**

We also analyzed high-order interactions between SNPs using the multifactor dimensionality reduction (MDR) algorithm [31]. MDR results were considered statistically significant at the level of 0.05 and were confirmed by permutation testing. MDR software and the MDR permutation testing module are freely available at: <http://www.epistasis.org>.

**Genotype-phenotype correlation analysis**

To assess the biological plausibility of our genetic findings, we evaluated the correlation between SNPs and mRNA gene expression in 44 blood samples from healthy donors. Total RNAs were extracted using a PAXGENE Blood RNA Isolation Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) and reverse transcribed to cDNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Crawley, UK). Real-time qPCR was carried out using PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland, USA) and Geneglobe primers (Hs\_IL4\_SG and Hs\_GAPDH\_2\_SG QuantiTect Primer Assays) in an ABI PRISM 7500 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). All samples were run in triplicate and relative quantification of IL4 mRNA was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. Gene expression levels between genotypes were compared using the Mann-Whitney *U*-test. We also evaluated a possible correlation of IL4 mRNA with genotypes using the GENE Expression VARIation Genevar (GENE Expression VARIation) database (available at: <https://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>).

**Response to anti-TNF medications**

RA patients treated either with infliximab, adalimumab, or etanercept were classified as ‘good responders’, ‘moderate responders,’ and ‘nonresponders’ according to the EULAR response criteria [25]. Anti-TNF-naive patients with a follow-up of at least 6 months were included and patients with self-reported non-White ancestry and those with missing values for DAS28 at baseline or at 6 months were excluded. Logistic regression analyses were carried out to evaluate the effect of immune-modulating variants on anti-TNF drug response. To avoid analytical biases, we first carried out the analysis comparing ‘good responders’ versus ‘nonresponders’ (excluding ‘moderate responders’) and subsequently we also carried out an analysis grouping ‘good responders’ and ‘moderate responders’.

**Results**

RA patients were slightly older ( $58.01 \pm 12.98$  vs.  $52.69 \pm 9.11$ ) and showed a lower male/female sex ratio than controls ( $230/1009 = 0.22$  vs.  $544/689 = 0.79$ , respectively). Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/A858>, shows additional information on RA patients and controls by region. The clinical characteristics of RA patients included in phases 1 and 2 are shown in Table 2.



**Table 2 Demographic and clinical characteristics of RA patients (phase I and II)**

Study population: RA patients	
Phase I	
Demographic characteristics	Overall (n = 371)
Age (years) (mean ± SD)	60.32 ± 13.65
Clinical assessment	
Percentage of patients with RF positivity	73.41
Percentage of patients with positive anti-CCP <sup>a</sup>	72.97
Current DAS28 (average)	3.25
Treatments [n (%)]	
DMARDs	
Methotrexate	201 (54.18)
Leflunomide	145 (39.08)
Sulphasalazine	35 (9.43)
Biologic agents	
Infliximab	118 (31.81)
Etanercept	116 (31.27)
Adalimumab	109 (29.38)
Abatacept	42 (11.32)
Rituximab	111 (29.92)
Tocilizumab	20 (5.39)
Others	8 (2.16)
Number of biologic agents [n (%)]	
0	118 (31.81)
1	105 (28.30)
2	71 (19.14)
3	45 (12.13)
4	20 (5.39)
> 4	12 (3.23)
Phase II	
Demographic characteristics	Overall (n = 926)
Age (years) (mean ± SD)	56.80 ± 12.71
Clinical assessment	
Percentage of patients with RF positivity	75.30
Percentage of patients with positive anti-CCP <sup>a</sup>	75.92
Current DAS28 (average)	3.65
Treatments [n (%)]	
DMARDs	
Methotrexate	722 (84.05)
Leflunomide	93 (10.83)
Sulphasalazine	161 (20.10)
Biologic agents	
Infliximab	292 (49.91)
Etanercept	226 (38.63)
Adalimumab	113 (19.32)
Abatacept	12 (2.05)
Rituximab	60 (10.26)
Tocilizumab	53 (9.06)
Others	26 (4.45)
Number of biologic agents	
0	341 (36.83)
1	448 (48.38)
2	94 (10.15)
3	30 (3.34)
4	10 (1.08)
> 4	3 (0.33)

Anti-CCP, anticyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; RF, rheumatoid factor.

<sup>a</sup>Anti-CCP value was available only in 314 patients.

In brief, patients included in phase 1 were slightly older than those included in phase 2 (60.32 ± 13.65 vs. 56.80 ± 12.71). Similarly, although the percentage of patients with positive rheumatoid factor and anti-citrullinated peptide antibodies was very similar in both cohorts, patients included in the second stage had a slightly higher value of DAS28 (3.25 vs. 3.65) and were more frequently treated with methotrexate (54.18 vs. 84.05%) and sulphasalazine (9.43 vs. 20.10%). In addition, patients in phase 2 were most often treated with biological agents.

All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium, with the exception of *IL4R*<sub>rs1805011</sub>, *IL10*<sub>rs3024509</sub> and *IL12A*<sub>rs582054</sub>. These SNPs were excluded from further analyses. Binary logistic regression analysis showed that carriers of the *IL4*<sub>rs2070874T</sub> allele had an increased risk of RA compared with those carrying the wild-type alleles ( $P=0.03$ ; Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/A859>), whereas, according to a log-additive model, carriers of the *IL8RB*<sub>rs1126580G</sub> and *VEGFA*<sub>rs25648T</sub> alleles tended to be associated with the risk of RA ( $P=0.09$  and  $P=0.08$ , respectively; Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/A859>). In addition, according to the log-additive model, carriers of the *IL4R*<sub>rs1801275G</sub> allele had a decreased risk of RA compared with those bearing the wild-type allele ( $P=0.08$ , Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/A859>).

In an attempt to further validate these preliminary findings, we extended our study by including 868 additional RA patients and 540 controls. We genotyped the most ‘promising’ SNPs from the phase 1 but also those SNPs included in their respective loci (Supplemental digital content 3, <http://links.lww.com/FPC/A860>). This strategy enabled us to confirm significant associations from phase 1 but also to reconstruct haplotype blocks for each relevant locus and to calculate haplotype association statistics. Overall analysis including 2468 participants confirmed that carriers of the *IL4*<sub>rs2070874T</sub> and *IL8RB*<sub>rs1126580G</sub> alleles and the *IL8RB*<sub>rs2230054C/C</sub> genotype had a significantly increased risk of RA ( $P=0.004$ , 0.005 and 0.02, respectively; Table 3 and Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/FPC/A859>). Interestingly, the association of the *IL4*<sub>rs2070874</sub>, *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> and *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> SNPs with RA was confirmed according to a log-additive model ( $P=0.0016$ , 0.002 and 0.01, respectively; Table 3 and Supplemental digital content 3, <http://links.lww.com/FPC/A860>), which suggested that a gene-dosage model for these genes is acting to determine the risk of the disease.

Haplotype reconstruction showed that the *IL4*<sub>rs2070874</sub> and *IL4*<sub>rs2243250</sub> variants were in LD ( $r^2=0.86$ ), whereas the *IL4*<sub>rs2243248</sub> represented an independent signal (Supplemental digital content 4A, <http://links.lww.com/FPC/A861>). Haplotype analysis confirmed that carriers of a common *IL4*<sub>CC</sub> haplotype had a significantly increased risk of developing RA compared with those carrying the most common haplotype ( $P=0.003$ ; Supplemental digital content 5, <http://links.lww.com/FPC/A862>). Similarly, we also observed that the *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> and *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> SNPs were in LD ( $r^2=0.77$ , Supplemental digital content 4B, <http://links.lww.com/FPC/A861>) and that individuals harbouring the *IL8RB*<sub>CG</sub> haplotype had a significantly increased risk of RA ( $P=0.001$ ; Supplemental digital content 5, <http://links.lww.com/FPC/A862>).

After correction for multiple testing with a study-wide threshold of  $P=0.0003$  required to maintain the type I error rate at 5%, none of the associations remained

**Table 3 Overall association of immunoregulatory polymorphisms and RA**

Variant_dbSNP	Gene	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>b</sup>	P-value
rs2243248	<i>IL4</i>	0.89 (0.67–1.18)	0.42	0.92 (0.70–1.20)	0.52
rs2243250	<i>IL4</i>	<b>1.32 (1.07–1.63)</b>	<b>0.01</b>	<b>1.24 (1.03–1.49)</b>	<b>0.02</b>
rs2070874	<i>IL4</i>	<b>1.37 (1.11–1.71)</b>	<b>0.004</b>	<b>1.37 (1.13–1.67)</b>	<b>0.0016</b>
rs2057768	<i>IL4R</i>	1.05 (0.87–1.26)	0.64	1.04 (0.89–1.21)	0.62
rs1801275	<i>IL4R</i>	0.86 (0.70–1.04)	0.12	0.89 (0.76–1.05)	0.18
rs2234671	<i>IL8RA</i>	0.89 (0.63–1.27)	0.52	0.91 (0.66–1.26)	0.57
rs2230054	<i>IL8RB</i>	<b>1.31 (1.05–1.63)<sup>c</sup></b>	<b>0.02</b>	<b>1.19 (1.04–1.36)</b>	<b>0.01</b>
rs1126580	<i>IL8RB</i>	<b>1.36 (1.10–1.69)</b>	<b>0.005</b>	<b>1.23 (1.08–1.41)</b>	<b>0.002</b>
rs20541	<i>IL13</i>	1.09 (0.89–1.35)	0.39	1.11 (0.93–1.33)	0.24
rs1295686	<i>IL13</i>	1.09 (0.89–1.33)	0.42	1.12 (0.95–1.33)	0.18
rs859	<i>IL16</i>	0.94 (0.77–1.13)	0.49	1.01 (0.87–1.16)	0.93
rs11325	<i>IL16</i>	1.07 (0.88–1.32)	0.49	1.06 (0.89–1.26)	0.53
rs2069705	<i>INFG</i>	0.92 (0.76–1.12)	0.41	0.97 (0.84–1.13)	0.70
rs1861494	<i>INFG</i>	1.10 (0.91–1.33)	0.34	1.04 (0.89–1.21)	0.63
rs2734648	<i>CCR5</i>	0.85 (0.69–1.03)	0.09	0.90 (0.79–1.03)	0.12
rs25648	<i>VEGFA</i>	1.11 (0.89–1.37)	0.34	1.07 (0.89–1.30)	0.46

Estimates were adjusted for age, sex and centre.

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis; SNP, single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.

<sup>b</sup>Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance.

<sup>c</sup>Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.

*P* < 0.05 in bold.

statistically significant. However, the association of the *IL4*<sub>rs2070874</sub> and *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> polymorphisms with an increased risk of RA was marginally significant when codominant, dominant or log-additive models of inheritance were assumed (Table 3 and Supplemental digital content 3, <http://links.lww.com/FPC/A860>). In support of the role of *IL4* and *IL8RB* SNPs in the susceptibility to RA, we also observed that the association of *IL4*<sub>CC</sub>T and *IL8RB*<sub>CC</sub> haplotypes with an increased risk of RA also remained marginally significant after multiple testing adjustments (*P* = 0.003 and 0.001; Supplemental digital content 5, <http://links.lww.com/FPC/A862>). Altogether, these findings suggest that both *IL4* and *IL8RB* loci may account for a proportion of inherited risk for RA.

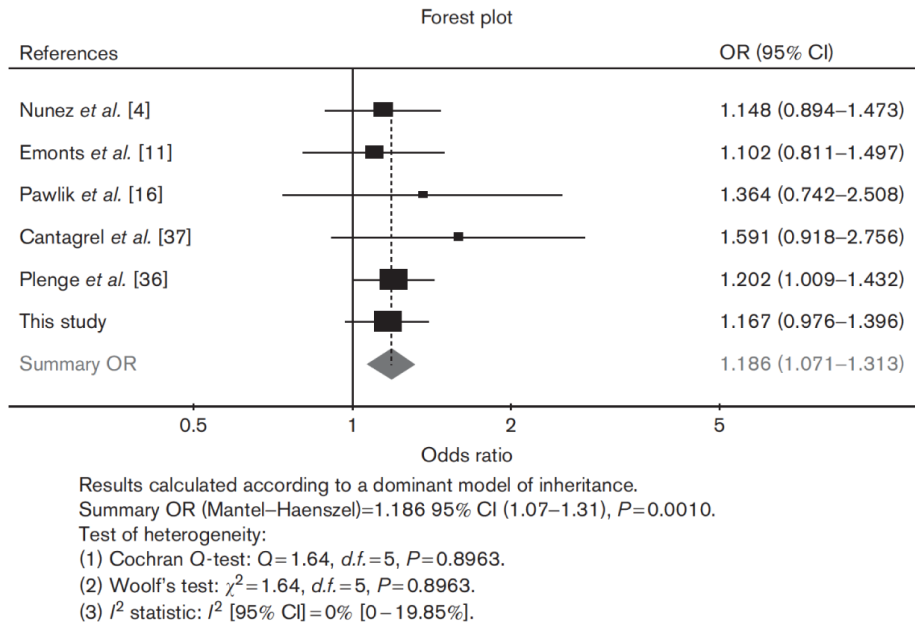
Considering these results and those of several previous studies reporting that the *IL4*<sub>rs2243250</sub> polymorphism is associated with the risk of RA, we also decided to carry out a meta-analysis to confirm this association (Fig. 1). To do this, we also genotyped the *IL4*<sub>rs2243250</sub> SNP, a genetic variant in strong LD with the *IL4*<sub>rs2070874</sub> variant (*r*<sup>2</sup> > 0.8), which allowed us to carry out the meta-analysis. As expected, we found that carriers of the *IL4*<sub>rs2243250</sub>T allele had a significantly increased risk of RA compared with carriers of the wild-type allele (*P* = 0.01). After a systematic review of the literature, we identified five published case-control studies assessing the effect of the *IL4*<sub>rs2243250</sub> polymorphism on the risk of RA in White. Together with our study cohort, the meta-analysis finally included 7150 individuals, 3883 RA cases and 3267 controls. A detailed description of these studies is shown in the Supplemental digital content 6, <http://links.lww.com/FPC/A863>. Considering the relatively low frequency of the *IL4*<sub>rs2243250</sub> SNP, we pooled the ORs included in the studies according to a dominant model of inheritance and assuming a fixed-effect model. Under these assumptions,

we could confirm that carriers of the *IL4*<sub>rs2243250</sub>T allele and consequently the *IL4* haplotype block were associated with a significantly increased risk of RA (*P* = 0.0010; Fig. 1). The funnel plot (or test of heterogeneity) showed a lack of publication bias (*P*<sub>het</sub> = 0.89; Supplemental digital content 7, <http://links.lww.com/FPC/A864>), which pointed out the potential interest of this meta-analysis and the feasibility of our candidate gene strategy to confirm *IL4* variants as biomarkers for susceptibility to RA. Unfortunately, we could not carry out additional meta-analyses to validate the overall association of *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> and *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> polymorphisms because of the lack of any previously published studies.

In support of the role of *IL8RB* in modulating susceptibility to RA, we found a significant two-locus interaction model consisting of *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> and *CCR5*<sub>rs2734648</sub> SNPs that suggested a synergistic effect to increase the risk of developing RA (*P* = 0.0107) (Supplemental digital content 8, <http://links.lww.com/FPC/A865>). The combination of *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> and *CCR5*<sub>rs2734648</sub> SNPs yielded a maximum cross-validation consistency of 10/10 and a testing accuracy of 0.5431. Permutation test confirmed the overall statistical significance of this interaction model (*P* = 0.028). In addition, the hierarchical cluster analysis placed the *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> SNP on a close branch, suggesting a three-locus interaction model to modulate the risk of RA. However, this model did not remain significant after permutation testing. A dendrogram representing interaction effects is shown in Fig. 2. Correction for multiple testing was not applicable to MDR results as we already evaluated the consistency of our results using the cross-validation consistency test, which assessed the reproducibility of MDR results across a comparison among different subsets of our population.

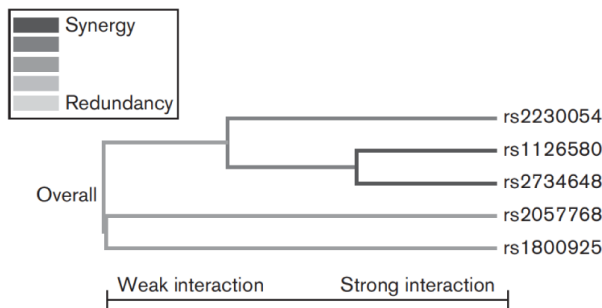


Fig. 1



Forest plot (fixed-effect model) of the meta-analysis for the  $IL4_{rs2243250}$  polymorphism and the risk of RA in White participants ( $n=7150$ ). CI, confidence interval; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis.

Fig. 2

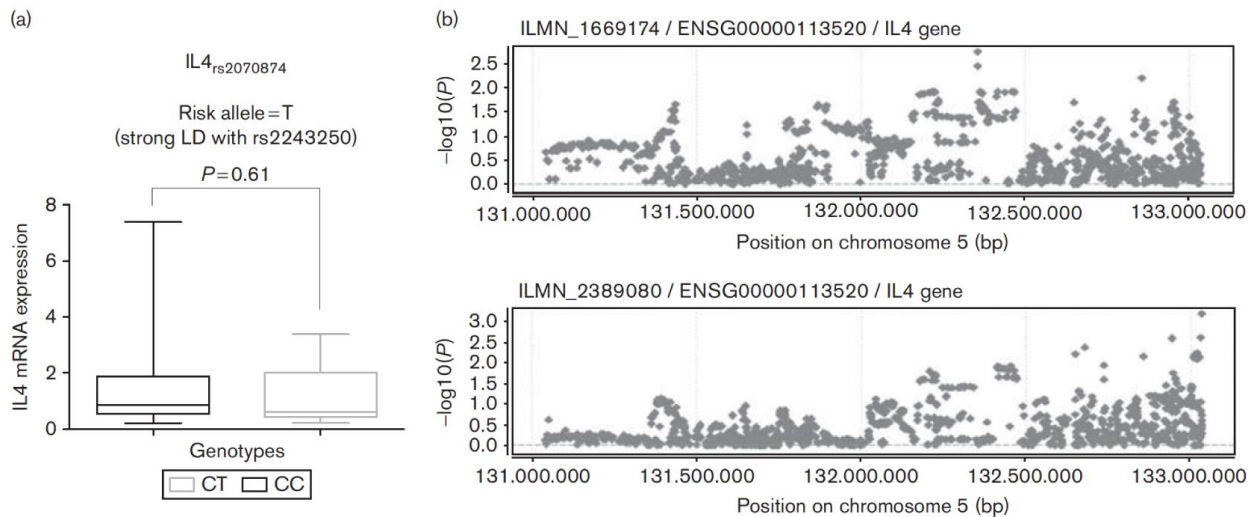


Interaction dendrogram generated by the MDR software. The interaction dendrogram was used to confirm, visualize and interpret the interaction models. The MDR analysis was carried out using the opensource MDR software package. The colours used show the degree of synergy, ranging from dark grey (highest information gain) to clear grey (highest information redundancy). Note that the interactions between IL8RB (rs1126580 or rs2230054) and CCR5 (rs2734648) SNPs showed the highest degree of synergy (gain of information). MDR, multifactor dimensionality reduction.

To assess whether the  $IL4$  SNPs influenced  $IL4$  gene expression, we correlated the presence of the most significant SNP ( $IL4_{rs2070874}$  in strong LD with  $IL4_{rs2243250}$ ) with the expression levels of  $IL4$  mRNA. To do this, we measured  $IL4$  mRNA expression in blood samples obtained from 44 healthy donors who were grouped according to their  $IL4_{rs2070874}$  genotype. Given the lack of

participants carrying the  $IL4_{rs2074874T/T}$  genotype among our population of healthy donors, we compared the expression levels between  $IL4_{rs2074874C/C}$  and  $IL4_{rs2074874C/T}$  participants. As shown in Fig. 3a, we did not find a positive correlation between the  $IL4_{rs2074874}$  SNP (and those SNPs in LD) and the levels of expression of  $IL4$  mRNA ( $P=0.61$ , Mann–Whitney  $U$ -test). These results were consistent with those reported previously by Grundberg *et al.* [32] using microarray-based gene expression data collected from primary fibroblasts, virus-immortalized lymphoblastoid cell lines and phytohaemagglutinin-stimulated primary T cells freely available through the use of the Genevar tool (Fig. 3b). Using this tool, we tested two probes that passed quality control assessment (Illumina expression probes ILM\_1669174 and ILM\_2389080) and we evaluated whether any of the 1338 SNPs within (or 1 Mb near) the  $IL4$  gene correlated with  $IL4$  mRNA gene expression levels. None of the  $IL4$  polymorphisms tested correlated with gene expression levels (Fig. 3b) and those SNPs in the LD block including  $IL4_{rs2070874}$  and  $IL4_{rs2243250}$  showed a  $P$  value of 0.41. These results strongly suggest that  $IL4$  SNPs rather than influencing  $IL4$  mRNA expression levels might have an impact on other subsequent biological processes such as mRNA processing (splicing or turnover) or mRNA stability or may even act at the post-transcriptional level. Further functional studies are warranted to experimentally identify the causative variant underlying the observed effect for  $IL4$  SNPs.

Fig. 3



*IL4* mRNA expression levels in PBMCs from healthy donors (a) and in three cell lines (b) grouped according to *IL4* genotypes. *IL4* mRNA gene expression data were collected from primary fibroblasts, virus-immortalized lymphoblastoid cell lines and phytohaemagglutinin-stimulated primary T cells, and were downloaded using Genevar tool publicly available at: <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>. LD, linkage disequilibrium.

Finally, given the importance of SNPs in immune-modulating genes in determining the disease risk, we decided to assess whether selected SNPs could also affect the response to anti-TNF drugs. In a first population including 149 naive anti-TNF patients (84 good responders and 65 nonresponders), we evaluated the association of selected 48 SNPs (excluding *IL4R*<sub>rs1805011</sub>, *IL10*<sub>rs3024509</sub> and *IL12A*<sub>rs582054</sub>) and drug response and then we attempted to confirm significant or borderline significant associations in a second population including 132 additional naive anti-TNF patients (77 good responders and 55 nonresponders). To improve the association analysis, we excluded 120 and 95 ‘moderate responders,’ respectively, from the anti-TNF cohorts. In the first population, we found that carriers of the *CCR5*<sub>rs2734648T</sub> allele had a worse response to anti-TNF drugs than those carrying the wild-type allele ( $P=0.04$ , Table 4), whereas carriers of the *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> allele showed a significantly better treatment response ( $P=0.009$ , Table 4). In addition, we also found that carriers of the *IFNG*<sub>rs1861494C</sub> and *IL4R*<sub>rs2057768A</sub> alleles tended to have a better response than those carrying the respective wild-type allele ( $P=0.065$  and  $0.067$ , respectively; Table 4). The overall analysis including 281 naive anti-TNF patients (161 good responders and 120 nonresponders) confirmed that carriers of the *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> allele had a significantly better treatment response than those carrying the wild-type allele ( $P=0.0075$ , Table 4). Of note, when 215 ‘moderate responders’ were included in the analysis, association estimates did not alter markedly (data not shown). Haplotype analysis showed that carriers of *IFNG*<sub>rs1861494C</sub>-

*IFNG*<sub>rs2069705C</sub> and *IFNG*<sub>rs1861494T</sub> and *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> haplotypes had a significantly better response to anti-TNF drugs than those carrying the most common haplotype ( $P=0.040$  and  $0.028$ , Table 4), which suggests that the *IFNG*<sub>rs2069705</sub> SNP rather than *IFNG* haplotype is responsible for the observed effect. Despite this potentially interesting finding, the association of the *IFNG*<sub>rs2069705</sub> SNP with drug response did not survive correction for multiple testing. Therefore, additional studies using larger and independent cohorts are required to confirm our results.

## Discussion

Genetic variants within immune-regulating genes partially determine the strength of immune responses against certain antigens [33] and, therefore, may play a key role in determining the risk of chronic inflammatory diseases. On the basis of this hypothesis, we sought to carry out a comprehensive two-stage case-control study to investigate whether 51 SNPs within 17 immune-modulating genes influence the risk of developing RA and anti-TNF drug response.

We found a significant association of *IL4*<sub>rs2070874</sub> and *IL4*<sub>rs2243250</sub> SNPs with an increased risk of developing RA. These SNPs were in strong LD with each other in our population, suggesting that these polymorphisms could be part of a risk LD block that might be important to predict the disease risk. Haplotype analysis including genetic variants in this locus, confirmed that carriers of the *IL4*<sub>CCT</sub> haplotype had a significantly increased risk of



Table 4 Association of immunoregulatory polymorphisms and response to anti-TNF drugs

Variant_dbSNP	Gene	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>b</sup>	P-value
rs2243248	<i>IL4</i>	1.31 (0.39–4.39) <sup>c</sup>	0.66		
rs2243250	<i>IL4</i>	0.86 (0.43–1.73)	0.68		
rs2070874	<i>IL4</i>	0.72 (0.36–1.46)	0.37		
rs2057768	<i>IL4R</i>	0.53 (0.27–1.05)	0.067	0.66 (0.40–1.10)	0.11
rs2107356	<i>IL4R</i>	1.46 (0.67–3.18)	0.33		
rs1801275	<i>IL4R</i>	1.07 (0.51–2.26)	0.86		
rs2069812	<i>IL5</i>	0.72 (0.36–1.43)	0.35		
rs4073	<i>IL8</i>	1.41 (0.63–3.15)	0.39		
rs2227306	<i>IL8</i>	0.95 (0.46–1.98)	0.90		
rs2227307	<i>IL8</i>	1.36 (0.63–2.91)	0.43		
rs2234671	<i>IL8RA</i>	2.28 (0.66–7.90)	0.19		
rs2230054	<i>IL8RB</i>	1.23 (0.59–2.57)	0.59		
rs1126579	<i>IL8RB</i>	1.10 (0.54–2.23)	0.79		
rs1126580	<i>IL8RB</i>	1.51 (0.65–3.51)	0.34		
rs1800896	<i>IL10</i>	1.37 (0.67–2.80)	0.39		
rs1800871	<i>IL10</i>	1.05 (0.54–2.07)	0.88		
rs1800872	<i>IL10</i>	1.01 (0.51–2.00)	0.97		
rs3024491	<i>IL10</i>	1.43 (0.71–2.89)	0.31		
rs3024496	<i>IL10</i>	1.47 (0.73–2.96)	0.28		
rs9610	<i>IL10RA</i>	0.75 (0.33–1.72)	0.50		
rs568408	<i>IL12A</i>	0.95 (0.44–2.07)	0.90		
rs3212227	<i>IL12B</i>	0.84 (0.43–1.66)	0.62		
rs1800925	<i>IL13</i>	1.17 (0.59–2.32)	0.66		
rs20541	<i>IL13</i>	1.02 (0.50–2.08)	0.96		
rs1295686	<i>IL13</i>	0.90 (0.44–1.83)	0.78		
rs859	<i>IL16</i>	0.97 (0.49–1.91)	0.92		
rs11325	<i>IL16</i>	0.89 (0.41–1.89)	0.75		
rs2069705	<i>INFG</i>	<b>0.40 (0.20–0.81)</b>	<b>0.009</b>	<b>0.50 (0.30–0.83)<sup>d,e</sup></b>	<b>0.0075</b>
rs1861494	<i>INFG</i>	0.53 (0.27–1.04)	0.065	0.67 (0.40–1.11) <sup>d</sup>	0.12
rs1059293	<i>INFGR2</i>	1.33 (0.64–2.79)	0.44		
rs9808753	<i>INFGR2</i>	1.13 (0.51–2.50)	0.77		
rs1799987	<i>CCR5</i>	1.73 (0.85–3.55)	0.13		
rs2734648	<i>CCR5</i>	<b>2.06 (1.02–4.13)</b>	<b>0.04</b>	1.62 (0.97–2.72)	0.066
rs755622	<i>MIF</i>	1.47 (0.69–3.13)	0.32		
rs699947	<i>VEGFA</i>	0.69 (0.32–1.51)	0.35		
rs25648	<i>VEGFA</i>	0.81 (0.37–1.80)	0.61		
rs3024994	<i>VEGFA</i>	0.43 (0.13–1.36) <sup>c</sup>	0.14		
rs3025035	<i>VEGFA</i>	1.43 (0.57–3.59)	0.45		
rs2146323	<i>VEGFA</i>	0.72 (0.36–1.42)	0.34		
rs3024997	<i>VEGFA</i>	1.50 (0.74–3.02)	0.26		
rs3025030	<i>VEGFA</i>	0.51 (0.22–1.19)	0.11		
rs998584	<i>VEGFA</i>	0.69 (0.33–1.43)	0.32		
rs10434	<i>VEGFA</i>	0.92 (0.44–1.93)	0.82		
rs6899540	<i>VEGFA</i>	1.02 (0.51–2.05)	0.95		
rs6900017	<i>VEGFA</i>	1.34 (0.52–3.42) <sup>c</sup>	0.54		
rs6905288	<i>VEGFA</i>	1.18 (0.56–2.47)	0.66		

Estimates were adjusted for age, sex and centre.

anti-TNF, anti-tumor necrosis factor; CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>Population including 149 naive anti-TNF patients. Estimates were calculated according to a dominant model of inheritance and were adjusted by age and sex.

<sup>b</sup>Overall population including 281 naive anti-TNF patients. Estimates were adjusted by age, sex and centre.

<sup>c</sup>Estimates were calculated comparing heterozygotes versus monozygotes.

<sup>d</sup>*INFG*<sub>rs1861494C</sub> and *INFG*<sub>rs2069705C</sub> and *INFG*<sub>rs1861494T</sub> and *INFG*<sub>rs2069705C</sub> haplotypes were significantly associated with a better response to anti-TNF (OR = 0.63, 95% CI 0.41–0.98;  $P_{\text{hap}} = 0.040$  and OR = 0.32, 95% CI 0.12–0.88;  $P_{\text{hap}} = 0.028$ ). Haplotype estimates were adjusted for age, sex and centre.

<sup>e</sup>*INFG*<sub>rs2069705</sub> (per-allele OR = 0.57, 95% CI 0.38–0.86;  $P_{\text{trend}} = 0.0058$ ).

$P < 0.05$  in bold.

RA compared with the most common haplotype. These findings were in agreement with those from other recently published studies that reported significant associations of *IL4* genetic variants with the risk of RA [4, 8, 11, 16, 17, 34–37]. In particular, an association of the *IL4*<sub>rs2243250</sub> SNP with RA, a promoter polymorphism that has been associated with low serum levels of *IL4* in patients with RA, has been reported consistently [17]. When we attempted to validate these findings through a meta-analysis including these studies, we could confirm the association of the *IL4*<sub>rs2243250</sub> polymorphism with an increased risk of RA. However, given the lack of

correlation between *IL4* SNPs and gene expression levels of *IL4* mRNA, we suggest that a causative SNP in the *IL4* gene might affect other biological processes such as mRNA processing (splicing or turnover), mRNA stability and/or translatability.

In this study, we also found for the first time, to our knowledge, a significant association of *IL8RB* variants and their haplotypes with the risk of RA. Our results showed a significant association between the *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> and *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> SNPs and an increased risk of RA according to codominant, dominant and log-additive models of



inheritance, suggesting that a gene-dosage model is acting to determine the risk of the disease. Given the lack of previously published studies, we could not carry out a meta-analysis to validate these associations, but the haplotype reconstruction showed that *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> and *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> SNPs were in LD in our population and constituted haplotypes associated significantly with the risk of RA. Whereas the most common haplotype, *IL8RB*<sub>CC</sub>, was associated significantly with an increased risk of the disease, the *IL8RB*<sub>TA</sub> and *IL8RB*<sub>CA</sub> haplotypes were associated significantly with a decreased risk of RA. High-order SNP–SNP interaction analyses also showed interaction models including *IL8RB* and *CCR5* loci to increase the risk of RA, which again supported our hypothesis suggesting a possible role of *IL8RB* in determining the risk of developing disease.

Although the association of *IL4* and *IL8RB* variants or their haplotypes with the risk of RA was only close to the level of significance after multiple testing corrections, we still believe that these variants might account for a percentage of attributed susceptibility to RA. Many studies have shown that both *IL8* and *IL4* are major mediators of inflammation and joint destruction during RA [38–40]. Whereas *IL8* induces immune cell migration to the inflamed synovium and contributes towards perpetuation of inflammation and joint damage [41,42], *IL4* acts as an immune modulator by inhibiting *IL8*-mediated proinflammatory responses but also *IL1*-induced and *TNF*-induced Th<sub>1</sub> responses [38,43–45]. In this context, it is conceivable to suggest that genetic variants affecting the production or biological function of *IL4* and *IL8RB* may have an impact on the risk of developing RA. In support of this notion, a mounting body of evidence suggests that promoter and intronic variants may alter the transcription-binding sites or even that silent variants may affect protein expression through the alteration of mRNA splicing, mRNA stability and mRNA secondary structure [46–50], protein folding [51,52] and even protein function [53]. Therefore, we hypothesize that the *IL4* and *IL8RB* variants might be involved in the modulation of protein expression, thus determining the capability to induce *IL8*-mediated transendothelial migration and the recruitment of immune cells to the inflamed synovium. However, we cannot dismiss the possibility that other functional variants in strong LD with these SNPs may be responsible for determining the enhanced risk of RA through different mechanisms. In this respect, Shaw and colleagues suggested that genetic variants within *IL8RA*, *IL8RB* and the pseudogene *IL8RBP* (2q34/35 region) may affect the function of *NRAMP1*, a gene that encodes a 65 kDa protein (natural resistance-associated macrophage protein) with pleiotropic effects on macrophage function and that regulates the induction and perpetuation of autoimmune responses through the activation of *TNF* and *IL1β*, the production of *iNOS* and the expression of *MHC* class II to CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cells [54].

Finally, given the differences in response to anti-TNF drugs among RA patients and given the recently published results suggesting a role of immune-related variants in determining the response to anti-TNF medications [22,23,55], we found it interesting to evaluate the impact of selected polymorphisms on the response to anti-TNF treatments. We found that patients carrying the *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> allele showed a marginally significant better treatment response than those carrying the wild-type allele. A recent study has reported a significant association of an *IFNG* polymorphism with a worse response to anti-TNF drugs [56], suggesting that genetic variants involved in modulating *IFNG*-mediated inflammatory responses could also be important in determining the response to anti-TNF drugs. According to this study, we might hypothesize that patients carrying the *IFNG*<sub>rs2069705</sub> promoter polymorphism might have a lower production of *IFNG* compared with those carrying the wild-type allele and, consequently, to have attenuated *IFNG*-mediated immune responses that contribute towards reducing the inflammatory status, thus leading to a more effective reduction of *TNF*-induced immune responses when an anti-TNF medication is used. Further population-based case–control studies are warranted to replicate our findings and functional analyses are also required to explain the biological relevance of this SNP.

Our study has both strengths and weaknesses. The strengths of this study include a large population and a selection of potentially functional SNPs, which increased the possibility of identifying SNPs biologically relevant to RA. Although our results suggest that both *IL4* and *IL8RB* are ‘small-effect loci’ in RA (OR = 1.23–1.37), our study was sufficiently powered to detect such small effects. On the basis of the genotype frequencies observed in our study cohort, we had 80% power (log-additive model) to detect an OR of 1.33 at  $\alpha = 0.0003$  for a polymorphism with a minor allele frequency of 0.25. A limitation of this study is the lack of functional experiments that show the functional relevance of SNPs significantly associated with the risk of RA.

In conclusion, this case–control study suggests that polymorphisms within immune-modulating genes might have a modest impact on the risk of RA and response to anti-TNF drugs. Although a moderate effect on the risk RA may be attributed to *IL4* and *IL8RB* SNPs, further studies in larger and independent populations and other ethnic groups are warranted to confirm the role of the *IFNG* variant in the modulation of response to anti-TNF medications.

### Acknowledgements

The authors thank all participants who agreed to participate in this study. They also thank Biobanco-IMM (Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal) for providing blood samples from Portuguese RA patients and controls.



This work was supported by a grant from the Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental-Alejandro Otero (FIBAO) (Granada, Spain).

### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

### References

- Scivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1108**:312–322.
- Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev* 2011; **10**:599–608.
- Moreno O, Gonzalez CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martin J, *et al.* Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007; **34**:36–42.
- Nunez C, Santiago JL, Varade J, de la Calle H, Figueredo MA, Fernandez-Gutierrez B, *et al.* IL4 in the 5q31 context: association studies of type 1 diabetes and rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Immunogenetics* 2008; **60**:19–23.
- Hussein Y, El-Tarhouny S, Mohamed R, Pasha H, Abul-Saoud A. Association of interleukin-4 receptor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Joint Bone Spine* 2012; **79**:38–42.
- Wallis SK, Cooney LA, Endres JL, Lee MJ, Ryu J, Somers EC, *et al.* A polymorphism in the interleukin-4 receptor affects the ability of interleukin-4 to regulate Th17 cells: a possible immunoregulatory mechanism for genetic control of the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**:R15.
- Liu R, Xu N, Wang X, Shen L, Zhao G, Zhang H, *et al.* Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* 2012; **39**:6915–6922.
- Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Immunol Invest* 2013; **42**:455–469.
- Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, *et al.* The -1082A/G polymorphism in the interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine* 2011; **56**:351–355.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; **39**:81–87.
- Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, *et al.* Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet* 2011; **12**:36.
- Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012; **44**:1336–1340.
- Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, *et al.* Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 2012; **44**:511–516.
- Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; **42**:508–514.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014; **506**:376–381.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005; **26**:48–51.
- Hussein YM, El-Shal AS, Rezk NA, Abdel Galil SM, Alzahrani SS. Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population. *Cytokine* 2013; **61**:849–855.
- Burgos PI, Causey ZL, Tamhane A, Kelley JM, Brown EE, Hughes LB, *et al.* Association of IL4R single-nucleotide polymorphisms with rheumatoid nodules in African Americans with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; **12**:R75.
- Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yone CL, Spriewald B, *et al.* Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:1491–1500.
- Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, *et al.* Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007; **56**:2549–2556.
- Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, *et al.* Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; **48**:1841–1848.
- Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, *et al.* Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet* 2013; **9**:e1003394.
- Vasilopoulos Y, Bagiatis V, Stamatoopoulou D, Zisopoulos D, Alexiou I, Sarafidou T, *et al.* Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFR11 susceptibility variant with anti-TNF-alpha response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; **29**:701–704.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; **31**:315–324.
- Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996; **39**:34–40.
- Caliz R, Canet LM, Lupianez CB, Canhao H, Escudero A, Filipescu I, *et al.* Gender-specific effects of genetic variants within Th1 and Th17 cell-mediated immune response genes on the risk of developing rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2013; **8**:e72732.
- Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004; **74**:765–769.
- Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K. SNP\_tools: a compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res Notes* 2009; **2**:214.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; **22**:1928–1929.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; **296**:2225–2229.
- Moore JH. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; **4**:795–803.
- Grundberg E, Small KS, Hedman AK, Nica AC, Buil A, Keildson S, *et al.* Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nat Genet* 2012; **44**:1084–1089.
- Dinarello CA. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997; **11**:91–103.
- Marinou I, Till SH, Moore DJ, Wilson AG. Lack of association or interactions between the IL-4, IL-4Ralpha and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**:R80.
- Jiang Y, Zhang R, Zheng J, Liu P, Tang G, Lv H, *et al.* Meta-analysis of 125 rheumatoid arthritis-related single nucleotide polymorphisms studied in the past two decades. *PLoS One* 2012; **7**:e51571.
- Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, *et al.* Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in > 4000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005; **77**:1044–1060.
- Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, *et al.* Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**:1093–1100.
- Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, *et al.* Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1999; **1**:81–91.
- Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, *et al.* Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* 1991; **147**:2187–2195.
- Verburgh CA, Hart MH, Aarden LA, Swaak AJ. Interleukin-8 (IL-8) in synovial fluid of rheumatoid and nonrheumatoid joint effusions. *Clin Rheumatol* 1993; **12**:494–499.
- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, *et al.* IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**:R120–R128.

- 42 Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, *et al.* Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 1998; **187**:461–468.
- 43 Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood* 1997; **90**:2804–2809.
- 44 Lubberts E, Joosten LA, van Den Bersselaar L, Helsen MM, Bakker AC, van Meurs JB, *et al.* Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol* 1999; **163**:4546–4556.
- 45 Deleuran B, Iversen L, Kristensen M, Field M, Kragballe K, Thestrup-Pedersen K, *et al.* Interleukin-8 secretion and 15-lipoxygenase activity in rheumatoid arthritis: in vitro anti-inflammatory effects by interleukin-4 and interleukin-10, but not by interleukin-1 receptor antagonist protein. *Br J Rheumatol* 1994; **33**:520–525.
- 46 Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 2006; **7**:98–108.
- 47 Czech A, Fedyunin I, Zhang G, Ignatova Z. Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations. *Mol Biosyst* 2010; **6**:1767–1772.
- 48 Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* 2009; **578**:23–39.
- 49 Gu W, Zhou T, Wilke CO. A universal trend of reduced mRNA stability near the translation-initiation site in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Comput Biol* 2010; **6**:e1000664.
- 50 Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, *et al.* Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006; **314**:1930–1933.
- 51 Komar AA, Lesnik T, Reiss C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett* 1999; **462**:387–391.
- 52 Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol* 2008; **383**:281–291.
- 53 Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, *et al.* A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; **315**:525–528.
- 54 Shaw MA, Clayton D, Atkinson SE, Williams H, Miller N, Sibthorpe D, *et al.* Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *J Med Genet* 1996; **33**:672–677.
- 55 Prieto-Perez R, Cabaleiro T, Dauden E, Abad-Santos F. Gene polymorphisms that can predict response to anti-TNF therapy in patients with psoriasis and related autoimmune diseases. *Pharmacogenomics J* 2013; **13**:297–305.
- 56 Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, *et al.* Associations between functional polymorphisms in the NFkappaB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J* 2014; **14**:526–534.



**Supplementary Material:**

1) Haplotype association analysis of *IL4*, *IL4R* and *IL8RB* polymorphisms.

<i>IL4</i> _rs2070874	<i>IL4</i> _rs2243250	<i>IL4</i> _rs2243268	<i>IL4</i> _rs2243290	<i>IL4</i> _rs2243248	Frequency	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value
C	C	A	C	T	0.7734	1.00	
T	T	C	A	T	0.1322	<b>1.28 (1.05-1.56)</b>	<b>0.016</b>
C	C	A	C	G	0.0634	0.92 (0.69-1.22)	0.55
C	T	A	C	T	0.0122	0.74 (0.40-1.37)	0.34
<i>IL4R</i> _rs1801275 <i>IL4R</i> _rs2057768							
A	G				0.5483	1.00	
A	A				0.2459	0.92 (0.77-1.10)	0.35
G	G				0.1689	<b>0.78 (0.63-0.95)</b>	<b>0.016</b>
G	A				0.0368	1.48 (0.92-2.38)	0.10
<i>IL8RB</i> _rs2230054 <i>IL8RB</i> _rs1126580							
C	G				0.4712	1.00 †	
T	A				0.4683	<b>0.80 (0.70-0.92)</b>	<b>0.0017</b>
T	G				0.0399	0.87 (0.61-1.24)	0.44
C	A				0.0206	<b>0.59 (0.38-0.93)</b>	<b>0.023</b>

<sup>a</sup> Adjusted by age, sex and region.

† There was a significant association of the *IL8RB*<sub>CG</sub> haplotype with the risk of RA (OR=1.24, 95%CI 1.09-1.41, P=0.001).



## 2) Multifactor dimensionality reduction analysis summary

Model	TA	Sing Test (P-value)	P-value *	CVC
1 <i>IL8RB</i> <sub>rs1126580</sub>	0.5156	7 (0.1719)	NS	9/10
2 <i>IL8RB</i> <sub>rs1126580</sub> , <i>CCR5</i> <sub>rs2734648</sub>	0.5431	9 (0.0107)	<b>0.028†</b>	10/10
3 <i>IL8RB</i> <sub>rs1126580</sub> , <i>IL8RB</i> <sub>rs2230054</sub> , <i>CCR5</i> <sub>rs2734648</sub>	0.5304	8 (0.0547)	NS‡	6/10
4 <i>IL8RB</i> <sub>rs1126580</sub> , <i>IL4R</i> <sub>rs2057768</sub> , <i>CCR5</i> <sub>rs2734648</sub> , <i>IL13</i> <sub>rs1800925</sub>	0.5277	7 (0.1719)	NS	4/10

Abbreviations: TA, Testing accuracy; CVC, Cross-validation consistency; NS, not significant.

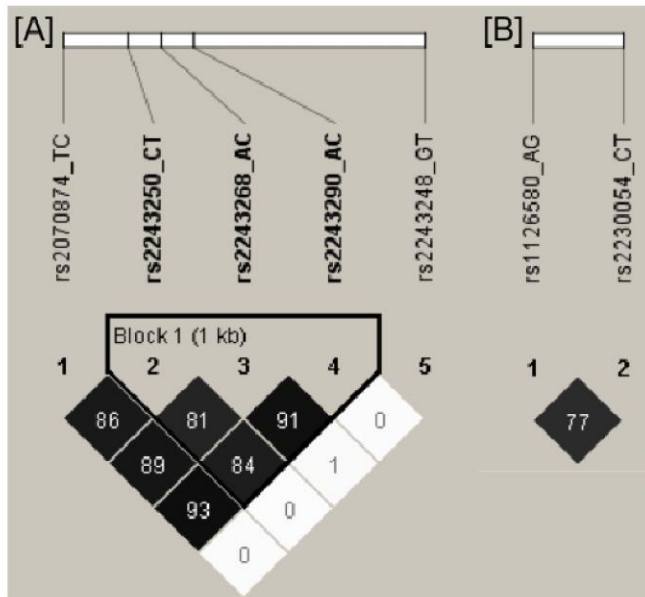
Cross-validation and permutation testing were used to identify the best models. All possible two-way SNP interactions were tested using 10-fold cross-validation and the exhaustive search. The model with the highest testing balanced accuracy (TA) and cross validation consistency (CVC) was selected as "best model". Statistical significance was evaluated by the Sign test and confirmed using a 1,000-fold permutation test to compare observed testing balanced accuracies with those expected under the null hypothesis of no association (using the MDR permutation testing module 0.4.9 alpha).

\* 1000-fold permutation test.

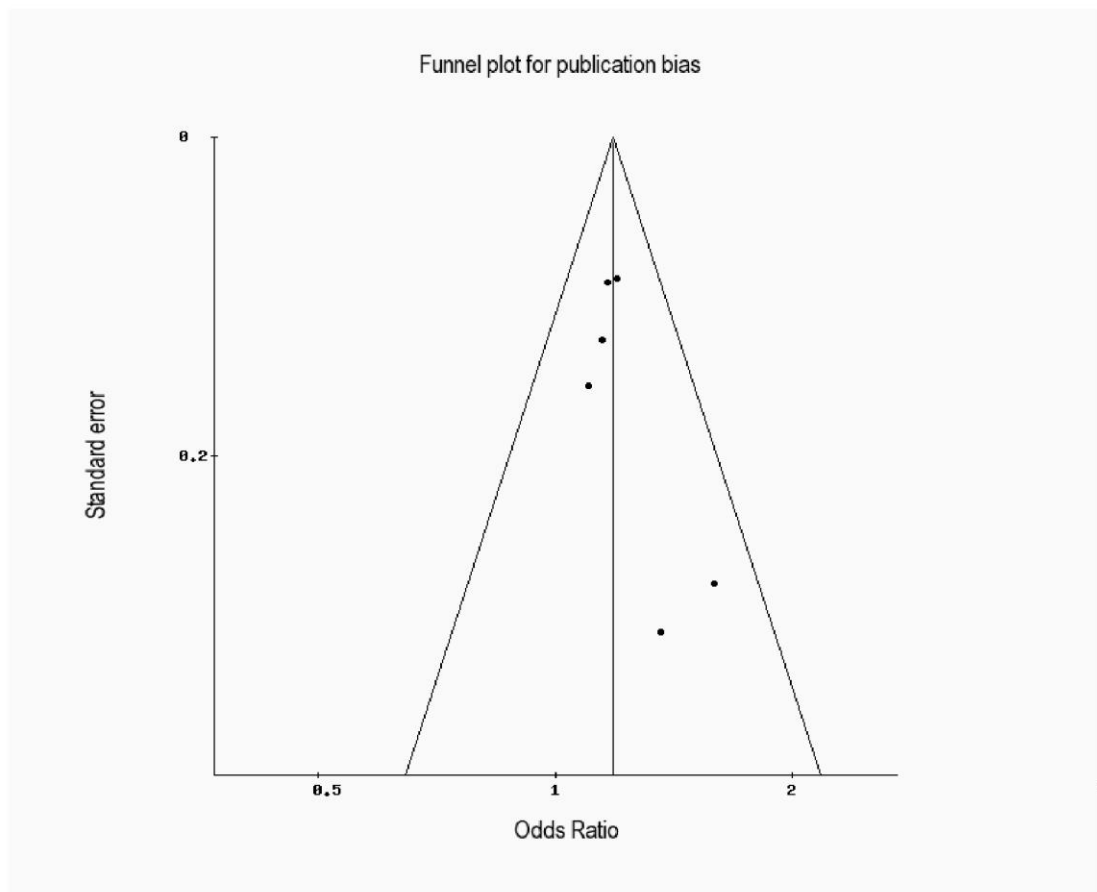
† Interaction was further confirmed by logistic regression ( $P=0.014$ ).

‡ Interaction was further confirmed by logistic regression ( $P=0.018$ ).

3) LD plots for IL4 (A) and IL8RB (B) genes.



4) Funnel plot to assess publication bias



5) Supplementary material: Details of the meta-analysis for the IL4 promoter polymorphism

Fixed effects ( Mantel-Haenszel ) meta-analysis			Polymorphism : rs2243250		
			Genetic model : TT+CT vs. CC ( dominant )		
Authors	PMID	Population	RA(A/a)	Control(A/a)	OR ( 95% CI )
Nunez C	18064451	Spanish	201/398	165/375	1.148 (0.894, 1.473)
Emonts M	21385363	Caucasian	105/267	121/339	1.102 (0.811, 1.497)
Pawlik A	15660235	Poland	32/62	28/74	1.364 (0.742, 2.508)
Cantagrel A	10366101	France	44/63	36/82	1.591 (0.918, 2.756)
Plenge RM	16380915	Sweden	563/940	291/584	1.202 (1.009, 1.432)
Canet L	-	Caucasian	359/859	309/863	1.1567(0.976, 1.396)

Results calculated according to a dominant model of inheritance.

Summary OR (Mantel-Haenszel)=1.186 95%CI (1.07-1.31), **P-value=0.0010**.

Test of heterogeneity:

(1) Cochran Q test: Q=1.64, df=5, P-value=0.8963.

(2) Woolf's test:  $X^2 = 1.64$ , df = 5, P-value = 0.8963.

(3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI]=0% [0%-19.85%].

### References (Table 1)

1. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Immunol Invest* 2013; **42**(6): 455-469.
2. Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005; **26**(1): 48-51.
3. Moreno O, Gonzalez CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martin J, *et al*. Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007; **34**(1): 36-42.
4. Pawlik A, Kurzawski M, Florczak M, Gawronska Szklarz B, Herczynska M. IL1beta+3953 exon 5 and IL-2 -330 promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005; **23**(2): 159-164.
5. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, *et al*. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**(6): 1093-1100.
6. Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, *et al*. A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* 2001; **53**(4): 264-269.
7. Hesselmar B, Bergin AM, Park H, Hahn-Zoric M, Eriksson B, Hanson LA, *et al*. Interleukin-4 receptor polymorphisms in asthma and allergy: relation to different disease phenotypes. *Acta Paediatr* 2010; **99**(3): 399-403.

8. Krabben A, Wilson AG, de Rooy DP, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, *et al.* Genetic variants in the IL-4 and IL-4 receptor genes in association with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis Rheum* 2013.
9. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, *et al.* The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 1999; **96**(3): 365-371.
10. Hussein Y, El-Tarhouny S, Mohamed R, Pasha H, Abul-Saoud A. Association of interleukin-4 receptor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Joint Bone Spine* 2012; **79**(1): 38-42.
11. Genevay S, Di Giovine FS, Perneger TV, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, *et al.* Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **47**(3): 303-309.
12. Zhu W, Liu N, Zhao Y, Jia H, Cui B, Ning G. Association analysis of polymorphisms in IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 with Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 2010; **33**(10): 751-755.
13. Walczak A, Przybylowska K, Dziki L, Sygut A, Chojnacki C, Chojnacki J, *et al.* The IL-8 and IL-13 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *DNA Cell Biol* 2012; **31**(8): 1431-1438.
14. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**(3): 671-676.
15. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, *et al.* Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet* 2011; **12**: 36.
16. Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, *et al.* The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine* 2011; **56**(2): 351-355.
17. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; **39**(1): 81-87.
18. de Paz B, Alperi-Lopez M, Ballina-Garcia FJ, Prado C, Mozo L, Gutierrez C, *et al.* Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha genotypes in rheumatoid arthritis--association with clinical response to glucocorticoids. *J Rheumatol* 2010; **37**(3): 503-511.
19. Nemeč P, Goldbergova MP, Gatterova J, Vasku A, Soucek M. Association of polymorphisms in interleukin-10 gene promoter with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1173**: 501-508.
20. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Lambropoulos A, Drosos AA. Genetics in rheumatoid arthritis beyond HLA genes: What meta-analyses have shown? *Semin Arthritis Rheum* 2013; **43**(1): 29-38.
21. Hee CS, Gun SC, Naidu R, Gupta E, Somnath SD, Radhakrishnan AK. Comparison of single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-10 gene promoter between rheumatoid arthritis patients and normal subjects in Malaysia. *Mod Rheumatol* 2007; **17**(5): 429-435.



22. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, *et al.* Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007; **56**(8): 2549-2556.
23. Filer C, Ho P, Smith RL, Griffiths C, Young HS, Worthington J, *et al.* Investigation of association of the IL12B and IL23R genes with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; **58**(12): 3705-3709.
24. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinzmann A. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. *J Infect Dis* 2006; **193**(3): 438-441.
25. van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, *et al.* An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1999; **1**(1): 61-65.
26. Bowes J, Eyre S, Flynn E, Ho P, Salah S, Warren RB, *et al.* Evidence to support IL-13 as a risk locus for psoriatic arthritis but not psoriasis vulgaris. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**(6): 1016-1019.
27. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, *et al.* Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**(6): 980-987.
28. Li X, Ampleford EJ, Howard TD, Moore WC, Torgerson DG, Li H, *et al.* Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **130**(4): 861-868 e867.
29. Kumar A, Ghosh B. A single nucleotide polymorphism (A --> G) in intron 3 of IFNgamma gene is associated with asthma. *Genes Immun* 2008; **9**(4): 294-301.
30. Prahalad S, Bohnsack JF, Jorde LB, Whiting A, Clifford B, Dunn D, *et al.* Association of two functional polymorphisms in the CCR5 gene with juvenile rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2006; **7**(6): 468-475.
31. Xie Q, Wang SC, Bian G, Zhan FL, Xie JK, Li J. Association of MIF-173G/C and MBL2 codon 54 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2012; **73**(9): 966-971.
32. Martinez A, Orozco G, Varade J, Sanchez Lopez M, Pascual D, Balsa A, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility. *Hum Immunol* 2007; **68**(9): 744-747.
33. Radstake TR, Sweep FC, Welsing P, Franke B, Vermeulen SH, Geurts-Moespot A, *et al.* Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 2005; **52**(10): 3020-3029.
34. Eder L, Chandran V, Ueng J, Bhella S, Lee KA, Rahman P, *et al.* Predictors of response to intra-articular steroid injection in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010; **49**(7): 1367-1373.
35. Chen Y, Dawes PT, Matthey DL. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: differential effect of cigarette smoking. *Cytokine* 2012; **58**(3): 390-397.

36. Chen Y, Dawes PT, Packham JC, Matthey DL. Interaction between smoking and polymorphism in the promoter region of the VEGFA gene is associated with ischemic heart disease and myocardial infarction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; **38**(5): 802-809.
37. Lv HZ, Lin T, Xia LP, Shen H, Zhu XY, Zhang JT, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and rheumatoid arthritis. *J Investig Med* 2011; **59**(3): 593-598.

**Supplementary Table 1.** Association of immune-modulating polymorphisms with RA.

Variant information	Discovery population (n=1.057)			P-value
	Controls (%)	Cases (%)	OR (95CI) <sup>1</sup>	
IL4_rs2243248				
T/T	592 (88.0)	322 (91.0)	1.00	
G/T	79 (11.7)	32 (9.0)	0.71 (0.45-1.11)	
G/G	2 (0.3)	0 (0.0)	0.00 (0.00-NA)	0.15
T/T vs. G/T + G/G per G allele	81 (12.0)	32 (9.0)	0.69 (0.44-1.09) 0.68 (0.44-1.06)	0.10 0.09
IL4_rs2243250				
C/C	496 (73.3)	239 (66.8)	1.00	
C/T	159 (23.5)	108 (30.2)	<b>1.46 (1.07-1.99)</b>	
T/T	22 (3.2)	11 (3.1)	1.04 (0.47-2.28)	0.06
C/C vs. C/T + T/T per T allele	181 (26.7)	119 (33.2)	<b>1.41 (1.04-1.89)</b> 1.27 (0.99-1.64)	<b>0.03</b> 0.06
IL4_rs2070874				
C/C	458 (75.2)	246 (69.1)	1.00	
C/T	145 (23.8)	102 (28.6)	1.36 (0.99-1.87)	
T/T	6 (1.0)	8 (2.2)	2.54 (0.83-7.84)	<b>0.05</b>
C/C vs. C/T + T/T per T allele	151 (24.8)	110 (30.9)	<b>1.41 (1.04-1.93)</b> <b>1.41 (1.06-1.88)</b>	<b>0.03</b> <b>0.02</b>
IL4_rs2243268				
A/A	514 (76.2)	257 (72.0)	1.00	
A/C	146 (21.6)	91 (25.5)	1.26 (0.91-1.74)	
C/C	15 (2.2)	9 (2.5)	1.39 (0.58-3.37)	0.31
A/A vs. A/C + C/C per C allele	161 (23.9)	100 (28)	1.27 (0.93-1.74) 1.23 (0.94-1.62)	0.13 0.13
IL4_rs2243290				
C/C	512 (76.2)	251 (70.1)	1.00	
A/C	148 (22.0)	95 (26.5)	1.31 (0.95-1.81)	
A/A	12 (1.8)	12 (3.4)	<b>2.51 (1.05-6.00)</b>	<b>0.04</b>
C/C vs. A/C + A/A per A allele	160 (23.8)	107 (29.9)	<b>1.39 (1.02-1.90)</b> <b>1.40 (1.07-1.83)</b>	<b>0.04</b> <b>0.02</b>
IL4R_rs2057768				
G/G	364 (54.5)	184 (51.0)	1.00	
A/G	261 (39.1)	151 (41.8)	1.19 (0.90-1.59)	
A/A	43 (6.4)	26 (7.2)	1.21 (0.70-2.10)	0.44
G/G vs. A/G + A/A per A allele	304 (45.5)	177 (49.0)	1.20 (0.91-1.57) 1.14 (0.92-1.42)	0.20 0.23
IL4R_rs2107356				
G/G	224 (33.6)	110 (31.1)	1.00	
A/G	303 (45.4)	167 (47.2)	1.09 (0.79-1.49)	
A/A	140 (21.0)	77 (21.8)	1.16 (0.79-1.70)	0.74
G/G vs. A/G + A/A per A allele	443 (66.4)	244 (68.9)	1.11 (0.83-1.49) 1.08 (0.89-1.30)	0.49 0.44
IL4R_rs1801275				
A/A	421 (62.6)	239 (67.1)	1.00	
A/G	215 (31.9)	104 (29.2)	0.79 (0.59-1.07)	
G/G	37 (5.5)	13 (3.6)	0.65 (0.32-1.30)	0.21
A/A vs. A/G + G/G per G allele	252 (37.4)	117 (32.9)	0.77 (0.58-1.03) 0.80 (0.63-1.02)	0.10 0.08
IL5_rs2069812				
C/C	271 (40.1)	135 (38.4)	1.00	
C/T	308 (45.6)	163 (46.3)	1.04 (0.77-1.41)	
T/T	96 (14.2)	54 (15.3)	1.07 (0.71-1.62)	0.94
C/C vs. C/T + T/T per T allele	404 (59.9)	217 (61.6)	1.05 (0.79-1.39) 1.04 (0.85-1.26)	0.73 0.72
IL8_rs2227306				
C/C	220 (35.3)	125 (36.1)	1.00	
C/T	280 (44.9)	164 (47.4)	1.01 (0.74-1.38)	
T/T	124 (19.9)	57 (16.5)	0.77 (0.52-1.16)	0.36
C/C vs. C/T + T/T per T allele	404 (64.7)	221 (63.9)	0.94 (0.70-1.25) 0.90 (0.74-1.09)	0.67 0.29

IL8_rs2227307				
T/T	215 (31.9)	121 (34.4)	1.00	
G/T	307 (45.6)	155 (44.0)	0.86 (0.63-1.17)	
G/G	151 (22.4)	76 (21.6)	0.88 (0.60-1.28)	0.61
T/T vs. G/T + G/G per G allele	458 (68)	231 (65.6)	0.86 (0.64-1.15)	0.32
			0.93 (0.77-1.12)	0.44
IL8RA_rs2234671				
G/G	527 (91.8)	337 (94.7)	1.00	
G/C	45 (7.8)	17 (4.8)	0.62 (0.34-1.14)	
C/C	2 (0.4)	2 (0.6)	1.06 (0.15-7.71)	0.29
G/G vs. G/C + C/C per C allele	47 (8.2)	19 (5.3)	0.65 (0.36-1.16)	0.14
			0.71 (0.42-1.19)	0.19
IL8RB_rs2230054				
T/T	175 (28.0)	86 (24.3)	1.00	
C/T	283 (45.2)	184 (52.0)	1.38 (0.98-1.93)	
C/C	168 (26.8)	84 (23.7)	1.06 (0.72-1.57)	0.12
T/T vs. C/T + C/C per C allele	451 (72.0)	268 (75.7)	1.26 (0.92-1.73)	0.15
			1.03 (0.85-1.25)	0.75
IL8RB_rs1126579				
C/C	272 (40.7)	135 (39.2)	1.00	
C/T	301 (45.0)	155 (45.1)	1.08 (0.80-1.46)	
T/T	96 (14.3)	54 (15.7)	1.10 (0.73-1.67)	0.75
C/C vs. C/T + T/T Per T allele	397 (59.3)	209 (60.8)	1.09 (0.82-1.44)	0.46
			1.06 (0.87-1.29)	0.46
IL8RB_rs1126580				
A/A	196 (29.1)	93 (26.1)	1.00	
A/G	324 (48.1)	169 (47.3)	1.17 (0.85-1.63)	
G/G	153 (22.7)	95 (26.6)	1.38 (0.95-2.01)	0.21
A/A vs. A/G + G/G per G allele	477 (70.9)	264 (74.0)	1.24 (0.91-1.69)	0.17
			1.17 (0.97-1.42)	0.09
IL10_rs1800896				
A/A	233 (35.6)	112 (32.6)	1.00	
A/G	308 (47.1)	168 (49.0)	1.07 (0.79-1.47)	
G/G	113 (17.3)	63 (18.4)	1.09 (0.72-1.63)	0.82
A/A vs. A/G + G/G per G allele	421 (64.4)	231 (67.3)	1.08 (0.80-1.44)	0.62
			1.05 (0.86-1.28)	0.65
IL10_rs1800871				
C/C	389 (57.9)	203 (56.1)	1.00	
C/T	237 (35.3)	136 (37.6)	1.05 (0.78-1.40)	
T/T	46 (6.8)	23 (6.3)	0.82 (0.47-1.42)	0.69
C/C vs. C/T + T/T per T allele	283 (42.1)	159 (43.9)	1.01 (0.76-1.32)	0.97
			0.97 (0.78-1.20)	0.77
IL10_rs1800872				
C/C	390 (57.7)	197 (55.5)	1.00	
C/A	243 (36.0)	132 (37.2)	1.01 (0.76-1.36)	
A/A	43 (6.4)	26 (7.3)	1.03 (0.60-1.76)	0.99
C/C vs. C/A + A/A per A allele	286 (42.3)	158 (44.5)	1.02 (0.77-1.34)	0.90
			1.01 (0.82-1.26)	0.90
IL10_rs3024491				
G/G	241 (35.9)	128 (36.0)	1.00	
G/T	315 (46.9)	166 (46.6)	0.96 (0.71-1.30)	
T/T	116 (17.3)	62 (17.4)	0.97 (0.65-1.45)	0.97
G/G vs. G/T + T/T per T allele	431 (64.1)	228 (64.0)	0.96 (0.73-1.28)	0.80
			0.98 (0.81-1.19)	0.85
IL10_rs3024496				
T/T	242 (35.8)	120 (33.9)	1.00	
T/C	315 (46.5)	169 (47.7)	1.04 (0.77-1.41)	
C/C	120 (17.7)	65 (18.4)	1.03 (0.69-1.53)	0.97
T/T vs. T/C + C/C per C allele	435 (64.2)	234 (66.1)	1.04 (0.78-1.38)	0.80
			1.02 (0.84-1.24)	0.85
IL10RA_rs9610				
A/A	192 (28.5)	84 (23.7)	1.00	
A/G	325 (48.2)	189 (53.4)	1.27 (0.91-1.77)	
G/G	157 (23.3)	81 (22.9)	1.07 (0.72-1.58)	0.31
A/A vs. A/G + G/G	482 (71.5)	270 (76.3)	1.20 (0.88-1.65)	0.21

per G allele			1.04 (0.86-1.26)	0.61
IL12A_rs568408				
G/G	560 (82.2)	297 (81.6)	1.00	
A/G	116 (17.0)	61 (16.8)	0.98 (0.68-1.40)	
A/A	5 (0.7)	6 (1.6)	1.34 (0.39-4.59)	0.89
G/G vs. A/G + A/A	121 (17.8)	67 (18.4)	1.00 (0.70-1.42)	0.99
per A allele			1.02 (0.74-1.40)	0.91
IL12B_rs3212227				
A/A	419 (62.2)	207 (58.1)	1.00	
A/C	222 (32.9)	125 (35.1)	1.07 (0.80-1.43)	
C/C	33 (4.9)	24 (6.7)	1.45 (0.81-2.61)	0.46
A/A vs. A/C + C/C	255 (37.8)	149 (41.9)	1.12 (0.85-1.48)	0.44
per C allele			1.13 (0.90-1.42)	0.28
IL13_rs1800925				
C/C	440 (65.4)	222 (62.2)	1.00	
C/T	203 (30.2)	125 (35.0)	1.31 (0.98-1.76)	
T/T	30 (4.5)	10 (2.8)	0.96 (0.44-2.08)	0.18
C/C vs. C/T + T/T	233 (34.6)	135 (37.8)	1.28 (0.96-1.70)	0.09
per T allele			1.18 (0.93-1.51)	0.18
IL13_rs20541				
C/C	486 (74.4)	257 (71.6)	1.00	
C/T	146 (22.4)	95 (26.5)	1.28 (0.93-1.76)	
T/T	21 (3.2)	7 (2.0)	0.70 (0.28-1.73)	0.20
C/C vs. C/T + T/T	167 (25.6)	102 (28.4)	1.21 (0.89-1.65)	0.22
per T allele			1.11 (0.85-1.45)	0.44
IL13_rs1295686				
G/G	454 (69.4)	235 (66.4)	1.00	
A/G	179 (27.4)	106 (29.9)	1.17 (0.86-1.59)	
A/A	21 (3.2)	13 (3.7)	1.32 (0.62-2.82)	0.50
G/G vs. A/G + A/A	200 (30.6)	119 (33.6)	1.19 (0.88-1.59)	0.26
per A allele			1.16 (0.90-1.49)	0.24
IL16_rs859				
A/A	287 (44.6)	176 (49.3)	1.00	
A/G	293 (45.5)	145 (40.6)	0.77 (0.58-1.03)	
G/G	64 (9.9)	36 (10.1)	0.88 (0.55-1.41)	0.21
A/A vs. A/G + G/G	357 (55.4)	181 (50.7)	0.79 (0.60-1.04)	0.09
per G allele			0.87 (0.71-1.08)	0.20
IL16_rs11325				
G/G	458 (68.2)	235 (67.1)	1.00	
G/T	189 (28.1)	102 (29.1)	1.02 (0.75-1.39)	
T/T	25 (3.7)	13 (3.7)	1.04 (0.51-2.15)	0.99
G/G vs. G/T + T/T	214 (31.9)	115 (32.9)	1.02 (0.76-1.37)	0.87
per T allele			1.02 (0.80-1.31)	0.86
INFG_rs2069705				
T/T	325 (48.1)	169 (46.9)	1.00	
C/T	289 (42.8)	145 (40.3)	0.91 (0.68-1.21)	
C/C	61 (9.0)	46 (12.8)	1.50 (0.95-2.36)	0.11
T/T vs. C/T + C/C	350 (51.9)	191 (53.1)	1.01 (0.77-1.32)	0.96
per C allele			1.11 (0.90-1.36)	0.33
INFG_rs1861494				
T/T	382 (56.3)	170 (48.2)	1.00	
C/T	252 (37.1)	157 (44.5)	1.30 (0.98-1.73)	
C/C	45 (6.6)	26 (7.4)	1.21 (0.70-2.09)	0.18
T/T vs. C/T + C/C	297 (43.7)	183 (51.8)	1.29 (0.98-1.70)	0.07
per C allele			1.19 (0.96-1.48)	0.11
INFGR2_rs1059293				
C/C	237 (35.3)	120 (36.0)	1.00	
C/T	309 (46.0)	152 (45.6)	0.90 (0.66-1.23)	
T/T	126 (18.8)	61 (18.3)	0.97 (0.65-1.45)	0.81
C/C vs. C/T + T/T	435 (64.7)	213 (64.0)	0.92 (0.69-1.23)	0.58
per T allele			0.97 (0.80-1.18)	0.77
INFGR2_rs9808753				
A/A	553 (80.6)	303 (83.2)	1.00	
A/G	124 (18.1)	54 (14.8)	0.85 (0.59-1.23)	
G/G	9 (1.3)	7 (1.9)	2.14 (0.74-6.17)	0.24
A/A vs. A/G + G/G	133 (19.4)	61 (16.8)	0.92 (0.64-1.31)	0.63

per G allele			1.00 (0.73-1.36)	0.98
CCR5_rs1799987				
A/A	185 (27.9)	113 (32.3)	1.00	
A/G	335 (50.5)	172 (49.1)	0.82 (0.60-1.13)	
G/G	143 (21.6)	65 (18.6)	0.82 (0.55-1.22)	0.43
A/A vs. A/G + G/G	478 (72.1)	237 (67.7)	0.82 (0.61-1.11)	0.20
per G allele			0.89 (0.73-1.09)	0.27
CCR5_rs2734648				
G/G	235 (35.3)	152 (42.6)	1.00	
G/T	322 (48.4)	155 (43.4)	0.76 (0.56-1.02)	
T/T	109 (16.4)	50 (14.0)	0.78 (0.52-1.18)	0.16
G/G vs. G/T + T/T	431 (64.7)	205 (57.4)	0.76 (0.58-1.01)	0.06
per T allele			0.85 (0.70-1.04)	0.11
MIF_rs755622				
C/C	478 (70.6)	251 (69.5)	1.00	
C/G	183 (27.0)	101 (28.0)	1.06 (0.78-1.44)	
G/G	16 (2.4)	9 (2.5)	1.13 (0.48-2.68)	0.90
C/C vs. C/G + G/G	199 (29.4)	110 (30.5)	1.07 (0.79-1.44)	0.66
per G allele			1.06 (0.82-1.38)	0.65
VEGFA_rs699947				
C/C	203 (30.6)	102 (29.7)	1.00	
A/C	316 (47.6)	165 (48.1)	0.96 (0.70-1.33)	
A/A	145 (21.8)	76 (22.2)	1.15 (0.78-1.70)	0.63
C/C vs. A/C + A/A	461 (69.4)	241 (70.3)	1.02 (0.75-1.38)	0.90
per A allele			1.06 (0.88-1.29)	0.53
VEGFA_rs25648				
C/C	474 (73.2)	239 (68.5)	1.00	
C/T	160 (24.7)	102 (29.2)	1.34 (0.98-1.83)	
T/T	14 (2.2)	8 (2.3)	1.28 (0.50-3.26)	0.18
C/C vs. C/T + T/T	174 (26.9)	110 (31.5)	1.33 (0.99-1.81)	0.06
per T allele			1.27 (0.97-1.67)	0.08
VEGFA_rs3024994				
C/C	582 (87.3)	315 (87.5)	1.00	
C/T	81 (12.1)	44 (12.2)	0.97 (0.64-1.46)	
T/T	4 (0.6)	1 (0.3)	0.33 (0.03-3.29)	0.59
C/C vs. C/T + T/T	85 (12.7)	45 (12.5)	0.93 (0.62-1.40)	0.73
per T allele			0.90 (0.61-1.33)	0.61
VEGFA_rs3025035				
C/C	531 (80.1)	282 (79.2)	1.00	
C/T	127 (19.2)	67 (18.8)	1.06 (0.74-1.51)	
T/T	5 (0.8)	7 (2.0)	2.53 (0.74-8.62)	0.31
C/C vs. C/T + T/T	132 (19.9)	74 (20.8)	1.12 (0.80-1.58)	0.52
per T allele			1.17 (0.86-1.59)	0.33
VEGFA_rs2146323				
C/C	320 (46.9)	157 (44.7)	1.00	
A/C	290 (42.5)	162 (46.1)	1.12 (0.84-1.49)	
A/A	73 (10.7)	32 (9.1)	0.91 (0.56-1.47)	0.59
C/C vs. A/C + A/A	363 (53.1)	194 (55.3)	1.08 (0.82-1.42)	0.59
per A allele			1.01 (0.82-1.25)	0.91
VEGFA_rs3024997				
G/G	305 (45.7)	154 (44.1)	1.00	
A/G	288 (43.2)	150 (43.0)	1.00 (0.74-1.34)	
A/A	74 (11.1)	45 (12.9)	1.17 (0.75-1.83)	0.76
G/G vs. A/G + A/A	362 (54.3)	195 (55.9)	1.03 (0.78-1.36)	0.82
per A allele			1.06 (0.86-1.29)	0.60
VEGFA_rs3025030				
G/G	512 (77.7)	266 (76.4)	1.00	
C/G	127 (19.3)	70 (20.1)	1.08 (0.76-1.53)	
C/C	20 (3.0)	12 (3.5)	1.23 (0.56-2.71)	0.81
G/G vs. C/G + C/C	147 (22.3)	82 (23.6)	1.10 (0.79-1.53)	0.57
per C allele			1.09 (0.83-1.44)	0.52
VEGFA_rs998584				
G/G	193 (28.9)	106 (30.3)	1.00	
G/T	326 (48.9)	168 (48.0)	0.95 (0.69-1.31)	
T/T	148 (22.2)	76 (21.7)	0.92 (0.62-1.34)	0.90
G/G vs. G/T + T/T	474 (71.1)	244 (69.7)	0.94 (0.70-1.27)	0.68

per T allele			0.96 (0.79-1.16)	0.65
VEGFA_rs10434				
G/G	207 (31.4)	109 (31.1)	1.00	
A/G	317 (48.0)	166 (47.4)	0.98 (0.71-1.34)	
A/A	136 (20.6)	75 (21.4)	0.98 (0.66-1.44)	0.99
G/G vs. A/G + A/A	453 (68.6)	241 (68.9)	0.98 (0.73-1.32)	0.88
per A allele			0.99 (0.82-1.20)	0.91
VEGFA_rs6899540				
A/A	500 (73.6)	246 (68.5)	1.00	
A/C	165 (24.3)	108 (30.1)	1.31 (0.96-1.78)	
C/C	14 (2.1)	5 (1.4)	0.84 (0.28-2.47)	0.20
A/A vs. A/C + C/C	179 (26.4)	113 (31.5)	1.27 (0.94-1.72)	0.11
per C allele			1.20 (0.92-1.57)	0.19
VEGFA_rs6900017				
C/C	534 (79.1)	286 (83.6)	1.00	
C/T	136 (20.1)	55 (16.1)	0.85 (0.59-1.22)	
T/T	5 (0.7)	1 (0.3)	0.45 (0.05-4.13)	0.51
C/C vs. C/T + T/T	141 (20.9)	56 (16.4)	0.83 (0.58-1.20)	0.32
per T allele			0.83 (0.59-1.17)	0.28
VEGFA_rs6905288				
A/A	231 (34.2)	119 (33.7)	1.00	
A/G	323 (47.8)	168 (47.6)	0.99 (0.73-1.34)	
G/G	122 (18.1)	66 (18.7)	0.99 (0.67-1.47)	1.00
A/A vs. A/G + G/G	445 (65.8)	234 (66.3)	0.99 (0.74-1.32)	0.93
per G allele			0.99 (0.82-1.21)	0.95

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>1</sup>Models adjusted for age and gender.

**Supplementary Table 2.** Overall association of immune-modulating SNPs with RA (Phase 1+2).

Variant information	Overall population (n=2,468)		OR (95%CI) <sup>1</sup>	P-value
	Controls (%)	Cases (%)		
IL4_rs2243248				
T/T	1029 (87.1)	1042 (87)	1.00	
G/T	146 (12.4)	148 (12.3)	0.87 (0.65-1.16)	
G/G	6 (0.5)	8 (0.7)	1.52 (0.39-5.92)	0.53
T/T vs. G/T + G/G	152 (12.9)	156 (13.0)	0.89 (0.67-1.18)	0.42
Log-additive			0.92 (0.70-1.20)	0.52
IL4_rs2243250				
C/C	863 (73.6)	859 (70.5)	1.00	
C/T	275 (23.5)	325 (26.7)	<b>1.34 (1.07-1.67)</b>	
T/T	34 (2.9)	34 (2.8)	1.19 (0.68-2.11)	<b>0.04</b>
C/C vs. C/T + T/T	309 (26.4)	359 (29.5)	<b>1.32 (1.07-1.63)</b>	<b>0.01</b>
Log-additive			<b>1.24 (1.03-1.49)</b>	<b>0.02</b>
IL4_rs2070874				
C/C	864 (75.9)	878 (72.3)	1.00	
C/T	261 (22.9)	309 (25.4)	<b>1.32 (1.06-1.66)</b>	
T/T	14 (1.2)	28 (2.3)	<b>2.33 (1.10-4.96)</b>	<b>0.006</b>
C/C vs. C/T + T/T	275 (24.1)	337 (27.7)	<b>1.37 (1.11-1.71)</b>	<b>0.004</b>
Log-additive			<b>1.37 (1.13-1.67)</b>	<b>1.6 E-03</b>
IL4_rs2243290				
C/C	909 (75.8)	886 (72.7)	1.00	
A/C	271 (22.6)	299 (24.6)	<b>1.26 (1.01-1.58)</b>	
A/A	20 (1.7)	33 (2.7)	<b>2.37 (1.23-4.55)</b>	<b>0.006</b>
C/C vs. A/C + A/A	291 (24.2)	332 (27.3)	<b>1.33 (1.07-1.65)</b>	<b>0.009</b>
Log-additive			<b>1.34 (1.11-1.62)</b>	<b>2.6 E-03</b>
IL4_rs2243268				
A/A	908 (76.0)	903 (74.0)	1.00	
A/C	260 (21.8)	289 (23.7)	1.23 (0.98-1.54)	
C/C	27 (2.3)	29 (2.4)	1.54 (0.82-2.90)	<b>0.01</b>
A/A vs. A/C + C/C	287 (24.0)	318 (26.0)	<b>1.25 (1.01-1.56)</b>	<b>0.04</b>
Log-additive			<b>1.23 (1.02-1.49)</b>	<b>0.03</b>
IL4R_rs2057768				
G/G	619 (51.7)	609 (49.8)	1.00	
A/G	489 (40.9)	527 (43.1)	1.04 (0.86-1.27)	
A/A	89 (7.4)	87 (7.1)	1.07 (0.74-1.56)	0.88
G/G vs. A/G + A/A	578 (48.3)	614 (50.2)	1.05 (0.87-1.26)	0.64
Log-additive			1.04 (0.89-1.21)	0.62
IL4R_rs1801275				
A/A	763 (63.3)	785 (64.3)	1.00	
A/G	381 (31.6)	377 (30.9)	0.85 (0.69-1.04)	
G/G	61 (5.1)	59 (4.8)	0.91 (0.58-1.43)	0.29
A/A vs. A/G + G/G	442 (36.7)	436 (35.7)	0.86 (0.70-1.04)	0.12
Log-additive			0.89 (0.76-1.05)	0.18
IL8RA_rs2234671				
G/G	1002 (91.5)	1102 (91.8)	1.00	
G/C	89 (8.1)	93 (7.8)	0.88 (0.62-1.26)	
C/C	4 (0.4)	5 (0.4)	1.10 (0.23-5.24)	0.79
G/G vs. G/C + C/C	93 (8.5)	98 (8.2)	0.89 (0.63-1.27)	0.52
Log-additive			0.91 (0.66-1.26)	0.57
IL8RB_rs2230054				
T/T	321 (27.7)	300 (24.8)	1.00	
C/T	565 (48.8)	591 (48.8)	1.13 (0.90-1.43)	
C/C	272 (23.5)	319 (26.4)	<b>1.42 (1.09-1.85)</b>	<b>0.03</b>
C/C vs. T/T + C/T*	272 (23.5)	319 (26.4)	<b>1.31 (1.05-1.63)</b>	<b>0.02</b>
Log-additive			<b>1.19 (1.04-1.36)</b>	<b>0.01</b>
IL8RB_rs1126580				
A/A	331 (27.7)	278 (22.9)	1.00	
A/G	576 (48.2)	570 (46.9)	1.18 (0.93-1.49)	
G/G	288 (24.1)	368 (30.3)	<b>1.52 (1.17-1.98)</b>	<b>0.007</b>
A/A vs. A/G + G/G	864 (72.3)	938 (77.2)	<b>1.36 (1.10-1.69)</b>	<b>0.005</b>
Log-additive			<b>1.23 (1.08-1.41)</b>	<b>0.002</b>
IL13_rs20541				
C/C	841 (71.8)	840 (69.7)	1.00	



C/T	297 (25.3)	322 (26.7)	1.06 (0.85-1.31)	
T/T	34 (2.9)	43 (3.6)	1.46 (0.85-2.49)	0.37
C/C vs. C/T + T/T	331 (28.2)	365 (30.3)	1.09 (0.89-1.35)	0.39
Log-additive			1.11 (0.93-1.33)	0.24
IL13_rs1295686				
G/G	802 (67.6)	783 (65)	1.00	
A/G	346 (29.2)	372 (30.9)	1.03 (0.84-1.27)	
A/A	38 (3.2)	49 (4.1)	1.65 (0.99-2.76)	0.16
G/G vs. A/G + A/A	384 (32.4)	421 (35)	1.09 (0.89-1.33)	0.42
Log-additive			1.12 (0.95-1.33)	0.18
IL16_rs859				
A/A	537 (45.7)	576 (47.4)	1.00	
A/G	534 (45.4)	514 (42.3)	0.89 (0.73-1.09)	
G/G	105 (8.9)	126 (10.4)	1.17 (0.84-1.63)	0.22
A/A vs. A/G + G/G	639 (54.3)	640 (52.6)	0.94 (0.77-1.13)	0.49
Log-additive			1.01 (0.87-1.16)	0.93
IL16_rs11325				
G/G	833 (69.6)	823 (67.7)	1.00	
G/T	325 (27.1)	357 (29.4)	1.08 (0.87-1.33)	
T/T	39 (3.3)	36 (3.0)	1.05 (0.61-1.79)	0.78
G/G vs. G/T + T/T	364 (30.4)	393 (32.3)	1.07 (0.88-1.32)	0.49
Log-additive			1.06 (0.89-1.26)	0.53
INFG_rs1861494				
T/T	656 (54.4)	665 (54.6)	1.00	
C/T	472 (39.1)	483 (39.7)	1.13 (0.93-1.38)	
C/C	78 (6.5)	69 (5.7)	0.90 (0.60-1.36)	0.36
T/T vs. C/T + C/C	550 (45.6)	552 (45.4)	1.10 (0.91-1.33)	0.34
Log-additive			1.04 (0.89-1.21)	0.63
INFG_rs2069705				
T/T	565 (46.9)	610 (49.8)	1.00	
C/T	532 (44.1)	510 (41.6)	0.90 (0.74-1.10)	
C/C	108 (9.0)	105 (8.6)	1.05 (0.74-1.48)	0.50
T/T vs. C/T + C/C	640 (53.1)	615 (50.2)	0.92 (0.76-1.12)	0.41
Log-additive			0.97 (0.84-1.13)	0.70
CCR5_rs2734648				
G/G	421 (35.3)	473 (38.9)	1.00	
G/T	572 (48.0)	544 (44.7)	0.85 (0.69-1.05)	
T/T	199 (16.7)	200 (16.4)	0.83 (0.63-1.10)	0.24
G/G vs. G/T + T/T	771 (64.7)	744 (61.1)	0.85 (0.69-1.03)	0.09
Log-additive			0.90 (0.79-1.03)	0.12
VEGFA_rs25648				
C/C	849 (72.3)	883 (73.1)	1.00	
C/T	297 (25.3)	297 (24.6)	1.13 (0.90-1.41)	
T/T	29 (2.5)	28 (2.3)	0.93 (0.49-1.78)	0.55
C/C vs. C/T + T/T	326 (27.7)	325 (26.9)	1.11 (0.89-1.37)	0.34
Log-additive			1.07 (0.89-1.30)	0.46

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>1</sup>Models adjusted for age, gender and region.

\* Data according a recessive model of inheritance.



# *Artículo tercero*

---

## ***Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF $\alpha$ drugs: a multicenter study***

---

***Introducción y objetivos:*** Recientes estudios han sugerido que la presencia de ciertas variantes genéticas en el gen que codifica para el receptor tipo II del factor de necrosis tumoral (*TNFRSF1B*) puede ser un factor de predisposición para el desarrollo de AR. El objetivo del presente estudio fue evaluar si 5 polimorfismos “tagging” en el gen *TNFRSF1B* (que explican toda la variabilidad del locus) tienen un impacto sobre el riesgo de AR y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ .

***Materiales y métodos:*** En este estudio de casos y controles genotipamos 5 polimorfismos con sondas KASPar® (LGC Genomics) en un total de 1412 pacientes de AR y 1225 controles sanos. Seleccionamos 2 variantes en zonas codificantes (M196R, rs1061622 y E232K, rs5746026) y 3 variantes en la región reguladora 3’UTR del gen *TNFRSF1B* (rs1061624, rs1061631, rs3397). Los pacientes con AR fueron diagnosticados en base a los criterios establecidos por el ACR y el EULAR. El efecto de los polimorfismos seleccionados sobre el riesgo a padecer AR y la respuesta terapéutica se evaluó mediante análisis de regresión logística ajustados por edad, sexo y centro de origen. Para el análisis de asociación con la respuesta terapéutica se seleccionaron 596 pacientes tratados con fármacos anti-TNF $\alpha$  (infliximab, adalimumab o etanercept) en los que se estableció el nivel de respuesta de acuerdo a los criterios establecidos por la liga europea EULAR. Los valores estimados de asociación se expresaron mediante la OR y el IC al 95% y la significación estadística se estableció en  $P=0,0025$  ( $[0,05/5]/4$ ) en base al número de modelos genéticos analizados (co-dominante, dominante, recesivo, log-aditivo) y al número de marcadores genéticos analizados en base al método descrito por Li y colaboradores (2005). Finalmente, cuando fue posible, realizamos meta-análisis de nuestros datos de asociación con los previamente publicados.

***Resultados:*** Los individuos que portaban el alelo *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR que aquellos que portaban el genotipo más común (OR=1,40, IC 95% 1,16-1,71;  $P=0,0006$ ). Esta asociación sobrevivió la corrección por el test de múltiples comparaciones. Además, los resultados confirmaron que el SNP *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> no asociaba de forma significativa con el riesgo a padecer la enfermedad, ni en el análisis en nuestra cohorte (OR= 1,01, IC 95% 0,84-1,23;  $P=0,89$ ) ni en el meta-análisis realizado con los datos previamente publicados ( $P_{DOM}=0,67$  y  $P_{REC}=0,37$ ). Por otro lado, nuestros resultados revelaron los pacientes que portaban los genotipos *TNFRSF1B*<sub>rs3397C/C</sub>, *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub>, tenían un riesgo mayor de fracaso terapéutico tras la administración de fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR=2,34, IC 95% 1,21-4,50,  $P=0,014$ ; OR=3,84, IC 95% 1,45-10,22,  $P=0,0085$  y OR=2,94, IC 95% 1,16-7,46,  $P=0,028$ , respectivamente). Cuando asumimos un modelo de herencia log-aditivo se confirmó la asociación de los polimorfismos *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> con una peor respuesta a los fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR=1,55, IC 95% 1,08-2,22,  $P=0,018$  y OR=1,71, IC 95% 1,17-2,50;  $P=0,0059$ , respectivamente). Aunque estos resultados resultaban potencialmente interesantes, observamos que sólo el polimorfismo *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> permanecía marginalmente asociado con la respuesta terapéutica tras la corrección por múltiples comparaciones de acuerdo a un modelo log-aditivo. Sin embargo, esta asociación no pudo ser confirmada a través del meta-análisis con los datos existentes en la literatura ( $P=0,122$ ).

***Conclusión:*** Nuestros resultados sugieren que la variante *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> modula el riesgo de AR pero no proporcionan una evidencia sólida de la implicación de los polimorfismos analizados en la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Será necesario desarrollar estudios adicionales

para poder descifrar el papel del gen *TNFRSF1B* en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$ .

# Genetic variants within the *TNFRSF1B* gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study

Luz M. Canet<sup>a,\*</sup>, Ileana Filipescu<sup>h,\*</sup>, Rafael Cáliz<sup>c</sup>, Carmen B. Lupiañez<sup>a</sup>, Helena Canhão<sup>f,g</sup>, Alejandro Escudero<sup>d</sup>, Juana Segura-Catena<sup>a</sup>, María J. Soto-Pino<sup>c</sup>, Miguel A. Ferrer<sup>c</sup>, Antonio García<sup>c</sup>, Lurdes Romani<sup>c</sup>, Eva Pérez-Pampin<sup>e</sup>, Alfonso González-Utrilla<sup>c</sup>, Miguel A. López Nevot<sup>b</sup>, Eduardo Collantes<sup>d</sup>, João E. Fonseca<sup>f,g</sup> and Juan Sainz<sup>a</sup>

**Background** Recent research suggests that genetic variants in the tumor necrosis factor receptor 2 (*TNFRSF1B*) gene may have an impact on susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) and drug response. The present population-based case-control study was carried out to evaluate whether 5 tagging single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *TNFRSF1B* gene are associated with the risk of RA and response to antitumor necrosis factor (TNF) drugs.

**Methods** The study population included 1412 RA patients and 1225 healthy controls. A subset of 596 anti-TNF-naive RA patients was selected to assess the association of *TNFRSF1B* SNPs and drug response according to the EULAR response criteria.

**Results** We found that carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> allele had a significantly increased risk of developing RA ( $P=0.0006$ ). Importantly, this association remained significant after correction for multiple testing. We also confirmed the lack of association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP with the risk of RA in the single-SNP analysis ( $P=0.89$ ), but also through well-powered meta-analyses ( $P_{\text{DOM}}=0.67$  and  $P_{\text{REC}}=0.37$ , respectively). In addition, our study showed that carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C/C</sub>, *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub>, and *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> genotypes had an increased risk of having a worse response to anti-TNF drugs at the level of  $P$  less than 0.05 ( $P=0.014$ , 0.0085 and 0.028, respectively). We also observed that, according to a log-additive model, carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> or *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> alleles showed an increased risk of having worse response to anti-TNF

medications ( $P=0.018$  and 0.0059). However, the association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP only reached marginal significance after correction for multiple testing according to a log-additive model ( $P=0.0059$ ) and it was not confirmed through a meta-analysis ( $P_{\text{DOM}}=0.12$ ).

**Conclusion** Our results suggest that the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> variant may play a role in modulating the risk of RA, but does not provide strong evidence of an impact of *TNFRSF1B* variants in determining response to anti-TNF drugs. *Pharmacogenetics and Genomics* 25:323–333 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

*Pharmacogenetics and Genomics* 2015, 25:323–333

**Keywords:** anti-TNF, drug response, genetic variants, rheumatoid arthritis, susceptibility, *TNFRSF1B*/*TNFR2*

<sup>a</sup>Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research; Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, PTS Granada, Departments of <sup>b</sup>Immunology, <sup>c</sup>Rheumatology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, <sup>d</sup>Rheumatology Department, Reina Sofía Hospital, IMIBIC, University of Córdoba, Córdoba, <sup>e</sup>Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, <sup>f</sup>Rheumatology Research Unit, Molecular Medicine Institute, Medicine Faculty of Lisbon University, <sup>g</sup>Rheumatology Department, Santa Maria Hospital – CHLN, Lisbon, Portugal and <sup>h</sup>Rheumatology Department, University of Medicine and Pharmacy 'Iuliu Hatieganu' Cluj-Napoca, Romania

Correspondence to Juan Sainz, PhD, Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research; Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, PTS Granada, Avda. de la Ilustración, 114, 18016 Granada, Spain  
Tel: +34 958 715500; fax: +34 958 637071; e-mail: juan.sainz@genyo.es

\*Luz M. Canet and Ileana Filipescu contributed equally to the writing of this article.

Received 23 October 2014 Accepted 9 March 2015

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe and chronic autoimmune disease of unknown etiology that is determined, at least in part, by genetic factors and environmental influences [1]. Recent genome-wide association studies

(GWAS) have consistently identified numerous regions along the genome associated with the risk of RA [2–7] and drug response to different treatments [8–11]. In addition to GWAS, a number of candidate gene association studies (hypothesis-driven research) have pointed toward a major role of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in determining the susceptibility to RA [12–20], the occurrence of adverse clinical events [21–24], and the response to anti-tumor necrosis factor (TNF) drugs [25–27].

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website ([www.pharmacogeneticsandgenomics.com](http://www.pharmacogeneticsandgenomics.com)).

1744-6872 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/FPC.0000000000000140



Given the key role of the proinflammatory cytokine TNF $\alpha$  in the etiopathogenesis of RA [28], several studies have explored whether genetic polymorphisms within TNF-related genes (*TNF*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *T*, *TRAF1-C5*, *TNFAIP3*, *NFKB*, etc.) may influence the risk of RA [12,29–34] and its severity [22], but also the response to anti-TNF drugs [25,35–37]. Although some of these genes have been consistently identified as susceptibility loci for RA, some others need to be further investigated and validated. In particular, *TNFRSF1B* has been shown to be potentially interesting as several studies have suggested that SNPs within the *TNFRSF1B* gene are biologically functional [38–40] and may play a role in modulating the risk of RA [29–31,40–42] but also affect disease severity [41,43] and the response to anti-TNF drugs [35–37,44,45]. In addition, although a recent meta-analysis has supported the idea suggesting a role of a coding (rs1061622, M196R) polymorphism in modulating the risk of developing RA [46], most of the studies included were carried out in relatively small populations and yielded controversial results. Therefore, additional studies evaluating larger cohorts and a higher number of markers are urgently required to consistently establish whether variants within the *TNFRSF1B* gene might be useful to predict the risk of developing the disease and, more importantly, the response to anti-TNF therapies.

Thus, the aim of the present population-based case-control study was to assess whether five tagging polymorphisms within the *TNFRSF1B* gene may have an impact in modulating the risk of RA and response to anti-TNF medications. Given that previous studies have shown associations of the *TNFR*<sub>rs1061622</sub> SNP either with the risk of RA or drug response, we also carried out meta-analyses to further address these issues.

## Materials and methods

### Study population

The population included 2637 participants, 1412 RA patients and 1225 controls. All participants were White and provided their written informed consent to participate in the study, which was approved by the ethical review committee of the participating institutions. All RA patients were treated from January 2004 to January 2014 and they fulfilled the 1987 revised American College of Rheumatology (ACR) criteria [47] and the more recently published ACR/EULAR classification criteria [48]. A detailed description of the population has been reported elsewhere [14]. Briefly, 486 RA patients were recruited at the department of Rheumatology of the Virgen de las Nieves Hospital (Granada, Spain) and Reina Sofia Hospital (Córdoba, Spain) and 932 healthy controls were blood donor individuals recruited randomly at the Regional Blood Transfusion Centre (Granada-Almería, Spain). Seven hundred and seventy-three RA patients and 191 controls were also recruited from the Santa Maria

Hospital – CHLN (Biobanco-IMM; Lisbon Academic Medical Centre, Lisbon, Portugal), whereas 95 RA patients and 102 healthy controls were recruited from the Rheumatology Clinic of the University and Pharmacy ‘Tuliu Hatieganu’ Cluj-Napoca (Romania). Finally, 58 additional RA patients were recruited from the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spain). Twenty RA samples were excluded for technical reasons and therefore a total of 2617 individuals, 1392 RA patients and 1225 healthy controls, were available for genotyping.

### SNPs selection and genotyping

Five potentially functional SNPs within *TNFRSF1B* (rs1061622, rs1061624, rs1061631, rs3397, rs5746026) were selected for genotyping (Supplementary Table 1, Supplemental digital content 1, <http://links.lww.com/FPC/A839>). Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using the Qiagen Mini kit (Qiagen, Valencia, California, USA) and genotyping was carried out using allele-specific KASPar assays (LGC Genomics KBioscience, London, UK) according to the manufacturer’s specifications for a 384-well plate format (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). PCR products were analyzed with the ABI Prism 7900HT detection system using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). Five percent of samples were included in the PCR plates as duplicates and concordance between the analyzed original and duplicated samples was at least 99.0%. All SNPs showed a call rate of greater than 90.0%.

### Statistical analysis

Hardy–Weinberg equilibrium was assessed in the control group using a  $\chi^2$ -test. Logistic regression analysis adjusted for age, sex, and region was used to assess the main effects of the SNPs on the risk of RA and logistic regression analyses adjusted for age, sex, region, rheumatoid factor (RF), and anticitrullinated protein antibodies were used to evaluate the impact of these SNPs on modulating drug response. Controls and non-responders were used as the reference category in their respective analyses. Statistical power was estimated using Quanto software (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). All tests were carried out using the statistical software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and were considered to be statistically significant when *P* was up to 0.05. To account for multiple testing and reduce the rate of false positives, we also calculated an adjusted significance level using the Bonferroni correction. Considering the number of independent marker loci (tagging SNPs, *n* = 5) and the number of genetic inheritance models tested (codominant, dominant, recessive, and log-additive), the threshold used for the main effect analysis was therefore 0.0025 [(0.05)/5]/4.



### Haplotype analysis

SNPtool [49] and SNPstats [50] were used to reconstruct LD blocks and to calculate haplotype association statistics. Block structures were determined according to the method of Gabriel *et al.* [51] and were displayed graphically using  $r^2$  values.

### Response to anti-TNF medications

Five hundred and ninety-six anti-TNF-naïve patients were classified as ‘good responders’ ( $n=209$ ), ‘moderate responders’ ( $n=237$ ) and ‘nonresponders’ ( $n=150$ ) according to the EULAR response criteria [48]. Anti-TNF-naïve patients with a follow-up of at least 6 months were included and patients with self-reported non-White ancestry and those with missing values for DAS28 at baseline or at 6 months were excluded. Logistic regression analyses were carried out to evaluate the effect of *TNFRSF1B* variants on anti-TNF drug response. To avoid analytical biases, we first carried out the analysis by comparing ‘good responders’ versus ‘nonresponders’ (excluding ‘moderate responders’) and subsequently we also carried out an analysis grouping ‘good responders’ and ‘moderate responders’, which was a complementary strategy to better identify genetic markers associated with no response to anti-TNF drugs.

### Meta-analyses

To further assess the association of *TNFRSF1B* polymorphisms with the risk of RA and response to anti-TNF drugs, we also carried out meta-analyses with previously reported results. Existing publications were selected using DRAP (database of RA-related polymorphisms) but also through a meticulous search of PubMed (September 2014). The selection criteria to select publications were as follows: (a) case–control study in Whites; (b) study reporting genotype frequencies, odds ratio (OR), and  $P$ -values; and (c) RA or response to anti-TNF as an outcome for meta-analysis in susceptibility and drug response, respectively. We excluded those studies with no publically available data. We pooled the ORs for significant SNPs assuming a fixed-effect model. Coefficients with a  $P$ -value up to 0.05 were considered significant.

### Results

The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Briefly, RA patients were significantly older than the healthy controls ( $57.62 \pm 13.04$  vs.  $52.99 \pm 8.99$ ,  $P < 0.001$ ) and had a significantly higher female/male ratio ( $1125/267 = 4.21$  vs.  $680/545 = 1.24$ , respectively;  $P < 0.001$ ). The percentage of patients with positive RF and anticitrullinated peptide antibodies (anti-CCP) was 65.90 and 69.13%, respectively. The average of the current DAS28 was 3.56 and 42.35% of patients were treated at least with a biologic agent after the treatment with disease-modifying antirheumatic drugs.

**Table 1 Demographic and clinical characteristics of RA patients**

RA patients	
Demographic characteristics	Overall ( $N=1412$ )
Age (years)	$57.62 \pm 13.04$
Clinical assessment	
Percentage of patients with RF positivity ( $N=1239$ )	65.90
Percentage of patients with positive anti-CCP ( $N=801$ )	69.13
Current DAS28 (average)	3.56
Treatments	
DMARDs ( $N=1309$ ) [ $n$ (%)]	
Methotrexate	1128 (86.17)
Leflunomide	343 (26.20)
Sulfasalazine	216 (16.50)
Biologic agents ( $N=907$ ) [ $n$ (%)]	
Infliximab	423 (46.64)
Etanercept	368 (40.57)
Adalimumab	267 (29.44)
Abatacept	61 (6.73)
Rituximab	177 (19.51)
Tocilizumab	80 (8.82)
Others	33 (3.64)
Number of biologic agents ( $N=1412$ ) [ $n$ (%)]	
0	505 (35.76)
1	598 (42.35)
2	176 (12.46)
3	85 (6.02)
4	34 (2.41)
> 4	13 (0.92)

Data are represented as mean  $\pm$  SD.

Anti-CCP, anticyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor.

All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium, with the exception of *TNFRSF1B*<sub>rs746026</sub> ( $P < 0.001$ ), which was excluded from the analysis. Logistic regression analysis showed that carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> allele had an increased risk of RA compared with those carrying the wild-type allele [OR=1.40, 95% confidence interval (CI) 1.16–1.71,  $P=0.0006$ ; Table 2]. None of the other *TNFRSF1B* polymorphisms was associated significantly with the risk of disease (Table 2). Given the reported association for the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP with an increased risk of developing RA in previous small case–control studies, we also decided to further confirm our findings through well-powered meta-analyses according to dominant and recessive models of inheritance. These meta-analyses included our data but also those from seven case–control studies carried out previously in European White populations (4142 RA cases and 3331 controls). There was no statistically significant heterogeneity among individual studies and, according to dominant and recessive models, our results confirmed that the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> polymorphism was not associated with an increased risk of RA (OR=1.02, 95% CI 0.929–1.121,  $P=0.67$  and OR=1.09, 95% CI 0.898–1.333,  $P=0.37$ , respectively) (Fig. 1 and Supplemental Table 2, Supplemental digital content 2, <http://links.lww.com/JFPC/A840>). Although we attempted to further evaluate the association of *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNPs with the risk of developing RA by combining our genotype data with those from GWAS available freely through the Immunobase web site (<https://www.immunobase.org/page/Welcome!display>), we could not find genotype data for these

**Table 2 Association between TNFRSF1B polymorphisms and the risk of RA**

Gene_SNP	Overall population (n = 2617)					Including only RF-positive patients (n = 2207) (RF+ = 934)					Including only RF-negative patients (n = 1635) (RF- = 410)				
	Controls [n (%)]	Cases [n (%)]	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value		Controls [n (%)]	Cases [n (%)]	OR (95% CI) <sup>b</sup>	P-value		Controls [n (%)]	Cases [n (%)]	OR (95% CI) <sup>c</sup>	P-value	
<i>TNFRSF1B</i> _rs3397															
T/T	489 (42.9)	486 (38.6)	1.00			489 (42.9)	349 (39.3)	1.00			489 (42.9)	137 (37.1)	1.00		
C/T	520 (45.6)	629 (50.0)	<b>1.47 (1.20-1.80)</b>			520 (45.6)	439 (49.4)	<b>1.40 (1.11-1.77)</b>			520 (45.6)	190 (51.5)	<b>1.46 (1.11-1.94)</b>		
C/C	132 (11.6)	143 (11.4)	1.16 (0.85-1.60)	9.00 E-04		132 (11.6)	101 (11.4)	1.15 (0.80-1.66)	<b>0.015</b>		132 (11.6)	42 (11.4)	1.22 (0.79-1.89)	<b>0.028</b>	
T/T vs. C/T-C/C	652 (57.1)	772 (61.4)	<b>1.40 (1.16-1.71)</b>	6.00 E-04		652 (57.1)	540 (60.7)	<b>1.35 (1.08-1.69)</b>	<b>0.007</b>		652 (57.1)	232 (62.9)	<b>1.41 (1.08-1.85)</b>	<b>0.011</b>	
Log-additive			<b>1.19 (1.03-1.37)</b>	0.018				1.17 (0.99-1.38)	0.06				1.20 (0.99-1.46)	0.066	
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061622															
T/T	732 (64.5)	851 (64.2)	1.00			732 (64.5)	606 (64.7)	1.00			732 (64.5)	245 (62.8)	1.00		
G/T	349 (30.8)	409 (30.8)	0.99 (0.81-1.21)			349 (30.8)	292 (31.2)	0.98 (0.78-1.23)			349 (30.8)	117 (30.0)	0.98 (0.74-1.30)		
G/G	54 (4.8)	66 (5.0)	1.17 (0.76-1.80)	0.76		54 (4.8)	38 (4.1)	1.03 (0.62-1.71)	0.97		54 (4.8)	28 (7.2)	1.59 (0.94-2.69)	0.22	
T/T vs. G/T-G/G	403 (35.5)	475 (35.8)	1.01 (0.84-1.23)	0.89		403 (35.5)	330 (35.3)	0.98 (0.79-1.22)	0.88		403 (35.5)	145 (37.2)	1.06 (0.82-1.38)	0.66	
Log-additive			1.03 (0.88-1.21)	0.70				0.99 (0.83-1.19)	0.94				1.12 (0.91-1.38)	0.30	
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061624															
G/G	320 (27.3)	371 (28.3)	1.00			320 (27.3)	261 (28.4)	1.00			320 (27.3)	110 (28.3)	1.00		
A/G	573 (48.8)	617 (47.1)	1.03 (0.83-1.28)			573 (48.8)	432 (47.0)	1.03 (0.80-1.32)			573 (48.8)	185 (47.6)	1.02 (0.75-1.38)		
A/A	281 (23.9)	321 (24.5)	1.08 (0.83-1.40)	0.85		281 (23.9)	227 (24.7)	1.09 (0.82-1.46)	0.83		281 (23.9)	94 (24.2)	1.07 (0.75-1.53)	0.92	
G/G vs. A/G-A/A	854 (72.7)	938 (71.7)	1.05 (0.85-1.29)	0.67		854 (72.7)	659 (71.6)	1.05 (0.83-1.32)	0.69		854 (72.7)	279 (71.7)	1.04 (0.78-1.37)	0.81	
Log-additive			1.04 (0.91-1.18)	0.57				1.04 (0.90-1.21)	0.56				1.04 (0.87-1.24)	0.70	
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061631															
G/G	724 (64.3)	826 (63.5)	1.00			724 (64.3)	574 (63.1)	1.00			724 (64.3)	252 (64.6)	1.00		
A/G	351 (31.2)	410 (31.5)	0.87 (0.71-1.07)			351 (31.2)	289 (31.8)	0.84 (0.66-1.06)			351 (31.2)	121 (31.0)	0.87 (0.66-1.15)		
A/A	51 (4.5)	64 (4.9)	1.06 (0.67-1.66)	0.40		51 (4.5)	47 (5.2)	1.08 (0.65-1.79)	0.29		51 (4.5)	17 (4.4)	0.96 (0.51-1.83)	0.63	
G/G vs. A/G-A/A	402 (35.7)	474 (36.5)	0.90 (0.74-1.09)	0.27		402 (35.7)	336 (36.9)	0.87 (0.69-1.08)	0.21		402 (35.7)	138 (35.4)	0.88 (0.68-1.15)	0.36	
Log-additive			0.94 (0.80-1.10)	0.45				0.92 (0.77-1.11)	0.40				0.92 (0.73-1.15)	0.44	

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SNP, single-nucleotide polymorphism.

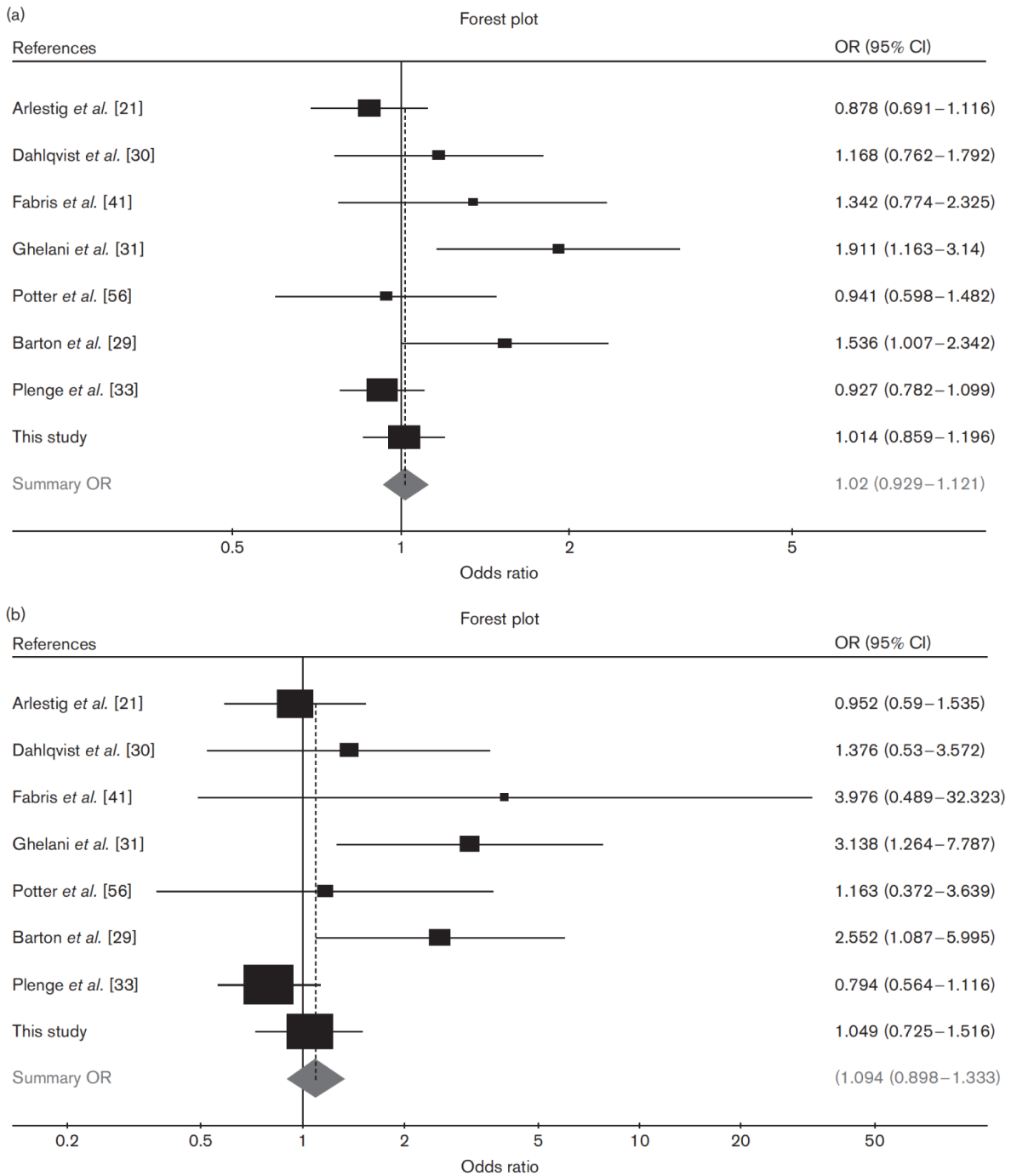
Significant results are in bold.

<sup>a</sup>Model adjusted for age, sex, and region.

<sup>b</sup>Model adjusted for age, sex, and region and considering only RF-positive patients.

<sup>c</sup>Model adjusted for age, sex, and region and considering only RF-negative patients.

Fig. 1



Forest plot (fixed-effect model) of the meta-analysis for the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> polymorphism and the risk of RA in White participants ( $n = 7473$ ) according to dominant (a) and recessive models (b). (a) Summary OR (Mantel-Haenszel) = 1.02 95% CI (0.929–1.121),  $P = 0.6743$ . Test of heterogeneity: (1) Cochran Q-test:  $Q = 13.95$ ,  $d.f. = 7$ ,  $P = 0.0521$ . (2) Woolf's test:  $\chi^2 = 13.95$ ,  $d.f. = 7$ ,  $P = 0.0521$ . (3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI] = 49.82% [0–77.59%]. (b) Summary OR (Mantel-Haenszel) = 1.09 95% CI (0.898–1.333),  $P = 0.3706$ . Test of heterogeneity: (1) Cochran Q-test:  $Q = 14.41$ ,  $d.f. = 7$ ,  $P = 0.0444$ . (2) Woolf's test:  $\chi^2 = 14.41$ ,  $d.f. = 7$ ,  $P = 0.0454$ . (3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI] = 51.42% [0–78.23%]. CI, confidence interval; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis.



polymorphisms in the genotyping platforms available (Affy 500K, Illumina 550K and Immunochip).

Haplotype analysis also showed that a rare haplotype including the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> risk allele (*TNFRSF1B*<sub>GGCCG</sub>, frequency = 0.0292) was associated significantly with an increased risk of RA (OR = 2.79, 95% CI 1.48–5.24,  $P = 0.0015$ ; Table 3), which strongly suggested that the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> SNP (or another neighboring SNP in strong linkage disequilibrium with it) rather than rare haplotypes could be responsible for the observed effect.

To evaluate whether *TNFRSF1B* variants had a specific effect on RF-positive or RF-negative patients, we also carried out an association analysis considering RF-positive and RF-negative patients separately when compared with controls. Importantly, we found that the effect of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> SNP on the susceptibility to RA was similar in both groups of patients and therefore independent of RF status (Table 2).

Next, we also assessed the role of *TNFRSF1B* SNPs in modulating the response to anti-TNF drugs. We found that carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> genotypes showed a considerably increased risk of having a worse response to anti-TNF drugs at the level of  $P$  less than 0.05 (OR = 4.19, 95% CI 1.19–14.7,  $P = 0.019$  and OR = 3.37, 95% CI 1.02–11.1,  $P = 0.040$ ; Table 4). We also found that, according to a log-additive model, carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> alleles had a statistically significant increase in the risk of having a worse response to anti-TNF medications (OR = 1.56, 95% CI 1.03–2.37,  $P = 0.036$  and OR = 1.60, 95% CI 1.02–2.51,  $P = 0.041$ , respectively).

When ‘moderate responders’ ( $n = 237$ ) were combined with ‘good responders’ ( $n = 209$ ), we found that patients carrying the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C/C</sub>, *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub>, or *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> genotypes showed a statistically significant association with a worse response to anti-TNF

drugs (OR = 2.34, 95% CI 1.21–4.50,  $P = 0.014$ , OR = 3.84, 95% CI 1.45–10.22,  $P = 0.0085$  and OR = 2.94, 95% CI 1.16–7.46,  $P = 0.028$ , respectively; Table 4). We also observed that, according to a log-additive model, individuals carrying the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> alleles showed a significantly increased risk of having worse response to anti-TNF medications (OR = 1.55, 95% CI 1.08–2.22,  $P = 0.018$  and OR = 1.71, 95% CI 1.17–2.50,  $P = 0.0059$ ; Table 4). Given that the association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP with an increased risk of having a worse response to anti-TNF drugs was reported previously and given that our study showed an effect for this SNP in the same direction, we also decided to carry out a meta-analysis to further test this association. The meta-analysis including 600 RA patients (335 responders and 265 nonresponders) showed that the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP is not associated with drug response either according to dominant or recessive models (OR = 1.303, 95% CI 0.932–1.823,  $P = 0.122$  and OR = 1.276, 95% CI 0.624–2.609,  $P = 0.503$ ; Fig. 2 and Supplementary Table 3, Supplemental digital content 3, <http://links.lww.com/FPC/A841>). There was no significant heterogeneity among individual studies, which confirmed the reliability of our results.

Haplotype analysis (excluding moderate responders) identified a common *TNFRSF1B*<sub>GACCT</sub> haplotype (including the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> allele, but not the *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A</sub> or the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> allele) to be associated significantly with an increased risk of having worse response to anti-TNF drugs (OR = 23.1852, 95% CI 1.1027–49.3374,  $P = 0.02716$ ; Table 5). Again, when ‘moderate responders’ were combined with ‘good responders,’ haplotype association estimates did not change markedly (Table 5).

Finally, although logistic regression analyses were already adjusted for RF, we decided to further evaluate the impact of RF in modulating the associations of *TNFRSF1B* variants with drug response. After stratifying

**Table 3 Haplotype association analysis of *TNFRSF1B* polymorphisms and the risk of RA**

Haplotype association analysis of <i>TNFRSF1B</i> SNPs and the risk of RA						
<i>TNFRSF1B</i> <sub>rs1061631</sub>	<i>TNFRSF1B</i> <sub>rs1061624</sub>	<i>TNFRSF1B</i> <sub>rs3397</sub>	<i>TNFRSF1B</i> <sub>rs1061622</sub>	Frequency	OR (95% CI) <sup>a</sup>	$P$ -value
G	G	T	T	0.264	1.00	–
G	A	C	T	0.1918	1.09 (0.87–1.37)	0.45
G	A	T	T	0.1117	0.82 (0.61–1.12)	0.21
G	G	T	G	0.0871	0.75 (0.53–1.07)	0.11
A	A	T	T	0.0855	1.22 (0.87–1.70)	0.26
G	G	C	T	0.0677	1.03 (0.67–1.58)	0.9
A	G	T	T	0.0402	0.93 (0.53–1.61)	0.79
G	G	C	G	0.0292	<b>2.79 (1.48–5.24)</b>	<b>0.0015</b>
A	A	C	T	0.0248	0.92 (0.44–1.91)	0.82
G	A	C	G	0.0222	1.56 (0.78–3.13)	0.21
G	A	T	G	0.0211	1.83 (0.88–3.84)	0.11

CI, confidence interval; OR, odds ratio; RA, rheumatoid arthritis; SNPs, single-nucleotide polymorphisms.

Significant results are in bold.

<sup>a</sup>Adjusted for age, sex, and region.

**Table 4 Association of TNFRSF1B SNPs with response to anti-TNF therapy**

Gene_SNP	RA patients (n = 359) <sup>a</sup>				RA patients (n = 471) <sup>b</sup>			
	R [n (%)] <sup>c</sup>	NR [n (%)] <sup>c</sup>	OR (95% CI) <sup>d</sup>	P-value	R/MR [n (%)]	NR [n (%)]	OR (95% CI) <sup>e</sup>	P-value
<i>TNFRSF1B</i> _rs3397								
T/T	59 (41.8)	30 (34.1)	1.00		128 (39.9)	31 (34.8)	1.00	
C/T	68 (48.2)	40 (45.5)	1.42 (0.75–2.69)		160 (49.8)	40 (44.9)	1.24 (0.71–2.15)	
C/C	14 (9.9)	18 (20.4)	<b>2.54 (1.06–6.10)</b>	0.10	33 (10.3)	18 (20.2)	<b>2.63 (1.27–5.45)</b>	<b>0.036</b>
C/C vs. T/T-C/T <sup>f</sup>	14 (9.9)	18 (20.4)	2.10 (0.95–4.68)	0.067	33 (10.3)	18 (20.2)	<b>2.34 (1.21–4.50)</b>	<b>0.014</b>
Log-additive			<b>1.56 (1.03–2.37)</b>	<b>0.036</b>			<b>1.55 (1.08–2.22)</b>	<b>0.018</b>
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061622								
T/T	99 (66.0)	60 (58.2)	1.00		243 (68.8)	60 (58.2)	1.00	
G/T	47 (31.3)	34 (33.0)	1.24 (0.69–2.22)		101 (28.6)	34 (33.0)	1.43 (0.87–2.34)	
G/G	4 (2.7)	9 (8.7)	<b>4.49 (1.26–15.9)</b>	<b>0.050</b>	9 (2.5)	9 (8.7)	<b>4.28 (1.59–11.53)</b>	<b>0.012</b>
G/G vs. T/T-G/T <sup>f</sup>	4 (2.7)	9 (8.7)	<b>4.19 (1.19–14.7)</b>	<b>0.019</b>	9 (2.5)	9 (8.7)	<b>3.84 (1.45–10.22)</b>	<b>0.0085</b>
Log-additive			<b>1.60 (1.02–2.51)</b>	<b>0.041</b>			<b>1.71 (1.17–2.50)</b>	<b>0.0059</b>
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061624								
G/G	43 (28.5)	28 (26.9)	1.00		99 (28.4)	28 (26.9)	1.00	
A/G	83 (55.0)	52 (50.0)	1.00 (0.53–1.89)		179 (51.3)	52 (50.0)	1.02 (0.60–1.74)	
A/A	25 (16.6)	24 (23.1)	1.80 (0.82–3.95)	0.24	71 (20.3)	24 (23.1)	1.21 (0.64–2.30)	0.81
G/G vs. A/G-A/A	108 (71.5)	76 (73.1)	1.18 (0.65–2.15)	0.59	250 (71.6)	76 (73.1)	1.07 (0.65–1.77)	0.79
Log-additive			1.31 (0.88–1.94)	0.18			1.10 (0.79–1.51)	0.58
<i>TNFRSF1B</i> _rs1061631								
G/G	98 (67.6)	69 (68.3)	1.00		200 (58.6)	69 (67.7)	1.00	
A/G	42 (29.0)	23 (22.8)	0.75 (0.40–1.42)		128 (37.5)	24 (23.5)	<b>0.50 (0.29–0.85)</b>	
A/A	5 (3.5)	9 (8.9)	3.12 (0.93–10.4)	0.08	13 (3.8)	9 (8.8)	2.34 (0.91–6.04)	
A/A vs. G/G-A/G <sup>f</sup>	5 (3.5)	9 (8.9)	<b>3.37 (1.02–11.1)</b>	<b>0.040</b>	13 (3.8)	9 (8.8)	<b>2.94 (1.16–7.46)</b>	<b>0.028</b>
Log-additive			1.19 (0.76–1.89)	0.45			0.87 (0.59–1.31)	0.51

ACPA, anticitrullinated protein antibodies; CI, confidence interval; MR, moderate responders; NR, nonresponders; OR, odds ratio; R, responders; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SNPs, single-nucleotide polymorphism; TNF, tumor necrosis factor.

Significant results are in bold.

<sup>a</sup>RF was available for 353 RA patients, whereas ACPA was available for 269 RA patients.

<sup>b</sup>RF was available for 589 RA patients, whereas ACPA was available for 473 RA patients.

<sup>c</sup>Anti-TNF response according to the EULAR criteria.

<sup>d</sup>Model adjusted for age, sex, region, RF, and ACPA status.

<sup>e</sup>Combined analysis grouping responders and moderate responders and adjusted for age, sex, region, RF, and ACPA status.

<sup>f</sup>Association according to the recessive model of inheritance.

our analysis by RF status, we observed that the effect of all *TNFRSF1B* polymorphisms on drug response was similar in RF-positive and RF-negative patients (Supplementary Table 4, Supplemental digital content 4, <http://links.lww.com/FPC/A842>). This confirmed that the modest associations observed for *TNFRSF1B* SNPs were not dependent on RF status.

When we corrected for multiple testing ( $P=0.0025$ ), only the overall association of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> variant with an increased risk of developing RA remained statistically significant. Although the association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP with drug response was also marginally significant after correction for multiple testing ( $P=0.0059$ ), this association was not further confirmed through a meta-analysis. None of the remaining *TNFRSF1B* variants retained a significant association with drug response after Bonferroni correction either in the single-SNP/haplotype analysis or in the meta-analysis.

## Discussion

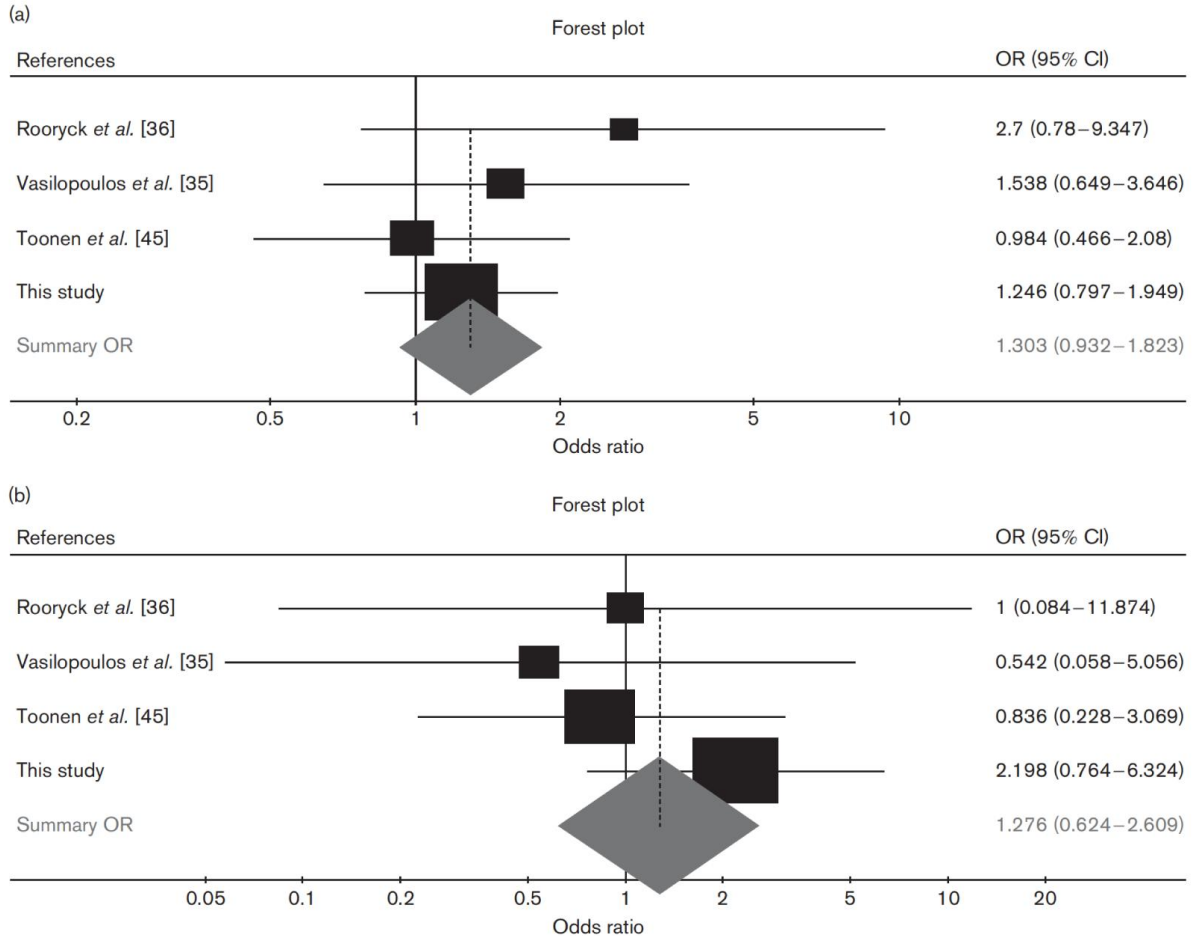
A growing number of studies suggest that TNF pathway-related variants may have an impact on the susceptibility to RA [3–7] and anti-TNF drug response [9–11,25,26,52]. In particular, recent candidate gene association studies have suggested that *TNFRSF1B* variants may be involved in determining the risk of disease [29–31,40–42] and,

most importantly, in modulating the response to anti-TNF drugs [36,37,53,54]. However, most of these studies showed contrary and inconclusive results. To shed light on the role of genetic variants within *TNFRSF1B* gene in these processes, we decided to perform a multicenter candidate gene association study to assess whether tagging SNPs within the *TNFRSF1B* gene influences the risk of developing RA and anti-TNF drugs response.

We found a statistically significant association between the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> polymorphism and the risk of developing RA. Importantly, this association survived after correction for multiple testing and it was independent of RF status, which suggests that genotyping of this variant together with well-established biomarkers might help to improve disease risk prediction. To our knowledge, this is the first study to report this association. Although a previous study developed by Bayley *et al.* [42] investigated this association, they found no association of this variant with the risk of developing RA likely because of the limited number of cases and controls that could have influenced the results. Our study included a large enough cohort of 2637 participants, 1412 RA patients and 1225 controls, and we had a reasonable statistical power to detect small effects. We had 80% of power (log-additive model) to detect an OR of 1.27 at  $\alpha=0.0025$  for a polymorphism with a minor allele frequency of 0.25.



Fig. 2



Forest plot (fixed-effect model) of the meta-analysis for *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> polymorphism and response to anti-TNF according to dominant (a) and recessive models of inheritance (b) ( $n = 600$ ). (a) Summary OR (Mantel-Haenszel) = 1.303, 95% CI (0.932–1.823),  $P = 0.1221$ . Test of heterogeneity: (1) Cochran Q-test:  $Q = 2.04$ ,  $d.f. = 3$ ,  $P = 0.5637$ . (2) Woolf's test:  $\chi^2 = 2.04$ ,  $d.f. = 3$ ,  $P = 0.5638$ . (3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI] = 0.0% [0–73.09%]. (b) Summary OR (Mantel-Haenszel) = 1.276, 95% CI (0.624–2.609),  $P = 0.5039$ . Test of heterogeneity: (1) Cochran Q-test:  $Q = 2.03$ ,  $d.f. = 3$ ,  $P = 0.5669$ . (2) Woolf's test:  $\chi^2 = 2.03$ ,  $d.f. = 3$ ,  $P = 0.5672$ . (3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI] = 0.0% [0–72.89%]. CI, confidence interval; OR, odds ratio; TNF, tumor necrosis factor.

None of the other tagging SNPs within the *TNFRSF1B* gene were associated with the risk of RA, which, along with the lack of significant associations for common haplotypes, suggested that the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> polymorphism rather than specific haplotypes might be involved in modulating the disease risk. In support of this notion, Puga *et al.* [39] reported that 3'-UTR-haplotypes negatively regulate *TNFRSF1B* mRNA stability, thus preventing an exacerbated activation of *TNFRSF1B*-mediated immune responses and chronic inflammation. According to the functional results of this interesting study, the presence of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> allele significantly reduces the *TNFRSF1B* mRNA decay, boosting *TNFRSF1B*-mediated inflammatory responses. In line with the results of this study, it seems reasonable to suggest that individuals carrying the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> allele have an uncontrolled *TNFRSF1B*-mediated immune response and

are prone to developing chronic inflammatory diseases such as Crohn's disease [55] or RA.

The association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNP with RA has been investigated extensively. However, most of these studies included small populations and showed controversial results [21,29–31,41,56]. Consistent with the results of some previous studies [21,30], we found no evidence for a statistically significant association of this variant with RA. Nonetheless, to further investigate the role of this polymorphism in determining the risk of RA, we decided to carry out a well-powered meta-analysis including 7473 individuals. Our results confirmed that the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> variant was not associated with the risk of developing the disease in European Caucasians. Although we attempted to further evaluate the association

Table 5 Haplotype association analysis of TNFRSF1B polymorphisms and response to anti-TNF drugs

Haplotype association analysis of TNFRSF1B and response to anti-TNF drugs						
TNFRSF1B_rs1061631	TNFRSF1B_rs1061624	TNFRSF1B_rs3397	TNFRSF1B_rs1061622	Frequency	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value
G	G	T	T	0.2797	1.00	—
G	A	C	T	0.2019	<b>2.18 (1.10–4.33)</b>	<b>0.027</b>
G	A	T	T	0.0993	1.68 (0.54–5.21)	0.37
A	A	T	T	0.0733	1.69 (0.49–5.79)	0.4
G	G	C	G	0.0682	1.58 (0.60–4.12)	0.35
G	G	C	T	0.066	2.91 (0.85–9.92)	0.089
G	G	T	G	0.0546	3.59 (0.81–15.98)	0.095
G	A	T	G	0.0409	1.53 (0.34–6.88)	0.58
A	G	T	T	0.0321	0.19 (0.02–1.84)	0.15
A	G	T	G	0.0238	12.83 (0.92–179.1)	0.059
A	G	C	T	0.0188	3.04 (0.32–29.03)	0.34
					OR (95% CI) <sup>a,b</sup>	P-value
					1.00	—
					<b>1.96 (1.12–3.46)</b>	<b>0.020</b>
					1.22 (0.42–3.52)	0.71
					0.64 (0.25–1.61)	0.34
					1.93 (0.82–4.52)	0.13
					2.01 (0.77–5.26)	0.16
					1.98 (0.74–5.33)	0.18
					2.13 (0.63–7.16)	0.22
					0.22 (0.03–1.80)	0.16
					7.74 (0.98–61.06)	0.053
					1.90 (0.33–10.89)	0.47

ACPA, anticitrullinated protein antibodies; CI, confidence interval; OR, odds ratio; RF, rheumatoid factor; TNF, tumor necrosis factor. Significant results are in bold.

<sup>a</sup>Adjusted by age, sex, region, RF, and ACPA.

<sup>b</sup>Grouping 'good responders' and 'moderate responders' versus 'nonresponders'.

of both *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNPs with RA by combining data of candidate gene association studies with those from GWAS, we could not find *TNFRSF1B* genotype data. Therefore, available results suggest that this variant does not play a relevant role in the etiopathogenesis of RA.

When we investigated the role of *TNFRSF1B* tagging polymorphisms in modulating anti-TNF drug response, we found that individuals carrying the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> genotypes had significantly worse response to anti-TNF drugs at the level of *P* less than 0.05. When a log-additive model was assumed, we also found a significant association of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> and *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> SNPs with worse response to anti-TNF drugs, which might suggest an allele–dosage effect of these SNPs in modulating *TNFRSF1B*-mediated immune response. Haplotype analysis showed a significant association for a common haplotype including the *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub>, but not the *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A</sub> or *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> alleles (*GACT*), with an increased risk of having a worse response to anti-TNF drugs. According to the findings reporting a functional role of the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> SNP in regulating *TNFRSF1B* mRNA decay but also in exacerbating *TNFRSF1B*-mediated immune responses [39], we might hypothesize that the presence of the polymorphism may influence the modulation of response to anti-TNFα medications.

When 'moderate responders' and 'good responders' were grouped, we confirmed that carriers of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> genotype showed an increased risk of having a worse response to anti-TNF, which is in agreement with the results of previous studies [36,37]. However, a meta-analysis combining our data with those of previous studies [35,36,45] did not confirm this association at the level of *P* less than 0.05. Interestingly, we also confirmed the association of the *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> but also *TNFRSF1B*<sub>rs3397C/C</sub> genotypes with an increased risk of having a worse response to anti-TNF drugs. Considering these results and that none of the associations with drug response remained significant after multiple testing, we concluded that our results do not provide a strong evidence of a relationship between *TNFRSF1B* variants and response to anti-TNF drugs. Despite these findings, we believe that the associations at 0.05 level are potentially interesting and need to be further investigated using larger and independent cohorts.

**Conclusion**

Our findings suggest that the *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> variant may play a key role in modulating the risk of developing RA, but do not provide strong evidence of the role of *TNFRSF1B* polymorphisms in modulating the response to anti-TNF medications. Additional research is now required to further investigate the impact of *TNFRSF1B* polymorphisms on anti-TNF drug response.



## Acknowledgements

The authors thank all participants who agreed to participate in this study. They thank María Dolores Casares, Ángeles Molina, and Carmen Olóriz for sample collection and technical support. They also thank Biobanco-IMM (Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal) for providing blood samples from Portuguese RA patients and controls.

This work was supported by a grant from the Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental-Alejandro Otero (FIBAO) (Granada, Spain).

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Selmi C, Lu Q, Humble MC. Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. *J Autoimmun* 2012; **39**:249–252.
- Bossini-Castillo L, de Kovel C, Kallberg H, van't Slot R, Italiaander A, Coenen M, et al. LifeLines Cohort Study. A genome-wide association study of rheumatoid arthritis without antibodies against citrullinated peptides. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**:e15.
- Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012; **44**:1336–1340.
- Jiang L, Yin J, Ye L, Yang J, Hemani G, Liu AJ, et al. Novel risk loci for rheumatoid arthritis in Han Chinese and congruence with risk variants in Europeans. *Arthritis Rheumatol* 2014; **66**:1121–1132.
- Kim K, Bang SY, Lee HS, Cho SK, Choi CB, Sung YK, et al. High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci. *Ann Rheum Dis* 2015; **74**:e13.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014; **506**:376–381.
- Orozco G, Viatte S, Bowes J, Martin P, Wilson AG, Morgan AW, et al. Novel rheumatoid arthritis susceptibility locus at 22q12 identified in an extended UK genome-wide association study. *Arthritis Rheumatol* 2014; **66**:24–30.
- Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, et al. GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2013; **14**:727–734.
- Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, et al. Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet* 2013; **9**:e1003394.
- Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, et al. Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci. *Arthritis Rheum* 2011; **63**:645–653.
- Umicevic Mirkov M, Cui J, Vermeulen SH, Stahl EA, Toonen EJ, Makinje RR, et al. Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**:1375–1381.
- Kurreeman FA, Rocha D, Houwing-Duistermaat J, Vrijmoet S, Teixeira VH, Migliorini P, et al. Replication of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 1/complement component 5 region as a susceptibility locus for rheumatoid arthritis in a European family-based study. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:2670–2674.
- Chang M, Rowland CM, Garcia VE, Schrodi SJ, Catanese JJ, van der Helm-van Mil AH, et al. A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2. *PLoS Genet* 2008; **4**:e1000107.
- Caliz R, Canet LM, Lupianez CB, Canhao H, Escudero A, Filipescu I, et al. Gender-specific effects of genetic variants within Th1 and Th17 cell-mediated immune response genes on the risk of developing rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2013; **8**:e72732.
- Leipe J, Schramm MA, Prots I, Schulze-Koops H, Skapenko A. Increased Th17 cell frequency and poor clinical outcome in rheumatoid arthritis are associated with a genetic variant in the IL4R gene, rs1805010. *Arthritis Rheumatol* 2014; **66**:1165–1175.
- Rodriguez-Rodriguez L, Taib WR, Topless R, Steer S, Gonzalez-Escribano MF, Balsa A, et al. The PTPN22 R263Q polymorphism is a risk factor for rheumatoid arthritis in Caucasian case-control samples. *Arthritis Rheum* 2011; **63**:365–372.
- Han TU, Bang SY, Kang C, Bae SC. TRAF1 polymorphisms associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Asians and in Caucasians. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:2577–2584.
- Daha NA, Kurreeman FA, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Verduijn W, Huizinga TW, Toes RE. Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:1255–1260.
- Lee YC, Raychaudhuri S, Cui J, De Vivo I, Ding B, Alfredsson L, et al. The PRL -1149 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:1250–1254.
- Orozco G, Abelson AK, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Garcia A, et al. Study of functional variants of the BANK1 gene in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:372–379.
- Arlestig L, Wallberg Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S. Polymorphism of genes related to cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; **25**:866–871.
- Valle Y, Padilla-Gutierrez JR, Torres-Carrillo NM, Ledezma-Lozano IY, Corona-Sanchez EG, Vazquez-Del Mercado M, et al. The -383Agt;C TNFR1 polymorphism is associated with soluble levels and clinical activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2010; **30**:655–659.
- Knevel R, de Rooy DP, Zernakova A, Grondal G, Krabben A, Steinsson K, et al. Association of variants in IL2RA with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2013; **65**:1684–1693.
- Van der Linden MP, Feitsma AL, le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:2242–2247.
- Bowes JD, Potter C, Gibbons LJ, Hyrich K, Plant D, Morgan AW, et al. Investigation of genetic variants within candidate genes of the TNFRSF1B signalling pathway on the response to anti-TNF agents in a UK cohort of rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenet Genomics* 2009; **19**:319–323.
- Krintel SB, Palermo G, Johansen JS, Germer S, Essioux L, Benayed R, et al. Investigation of single nucleotide polymorphisms and biological pathways associated with response to TNFalpha inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 2012; **22**:577–589.
- Plant D, Prajapati R, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Barton A. Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate. Replication of association of the PTPRC gene with response to anti-tumor necrosis factor therapy in a large UK cohort. *Arthritis Rheum* 2012; **64**:665–670.
- Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:163–196.
- Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 2001; **44**:61–65.
- Dahlqvist SR, Arlestig L, Siktstrom C, Linghult S. Tumor necrosis factor receptor type II (exon 6) and interleukin-6 (-174) gene polymorphisms are not associated with family history but tumor necrosis factor receptor type II is associated with hypertension in patients with rheumatoid arthritis from northern Sweden. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:3096–3098.
- Ghelani AM, Samanta A, Jones AC, Mastana SS. Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians of East Midlands in the United Kingdom. *Rheumatol Int* 2011; **31**:1355–1361.
- Kurreeman FA, Goulielmos GN, Alizadeh BZ, Rueda B, Houwing-Duistermaat J, Sanchez E, et al. The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**:696–699.
- Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis – a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; **357**:1199–1209.
- Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 2007; **39**:1431–1433.
- Vasilopoulos Y, Bagiatis V, Stamatopoulou D, Zisopoulos D, Alexiou I, Sarafidou T, et al. Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFR1I susceptibility variant with anti-TNF-alpha response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; **29**:701–704.
- Rooryck C, Barnetteche T, Richez C, Laleye A, Arveiler B, Schaefferbeke T. Influence of FCGR3A-V212F and TNFRSF1B-M196R genotypes in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2008; **26**:340–342.



- 37 Ongaro A, De Mattei M, Pellati A, Caruso A, Ferretti S, Masieri FF, et al. Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T > G polymorphism predict the response grading to anti-TNFalpha therapy in rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int* 2008; **28**:901–908.
- 38 Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Mascheretti-Croucher S, Croucher PJ, Schafer H, et al. The Met-196 > Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression. *J Biol Chem* 2005; **280**:5994–6004.
- 39 Puga I, Lainez B, Fernandez-Real JM, Buxade M, Broch M, Vendrell J, Espel E. A polymorphism in the 3' untranslated region of the gene for tumor necrosis factor receptor 2 modulates reporter gene expression. *Endocrinology* 2005; **146**:2210–2220.
- 40 Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Mathey DL. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**:R1227–R1234.
- 41 Fabris M, Toluoso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; **29**:1847–1850.
- 42 Bayley JP, Bakker AM, Kaijzel EL, Huizinga TW, Verweij CL. Association of polymorphisms of the tumour necrosis factor receptors I and II and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; **42**:969–971.
- 43 Constantin A, Dieude P, Lauwers-Cances V, Jamard B, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, et al. Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:742–747.
- 44 Medrano LM, Taxonera C, Marquez A, Barreiro-de Acosta M, Gomez-Garcia M, Gonzalez-Artacho C, et al. Role of TNFRSF1B polymorphisms in the response of Crohn's disease patients to infliximab. *Hum Immunol* 2014; **75**:71–75.
- 45 Toonen EJ, Coenen MJ, Kievit W, Fransen J, Eijsbouts AM, Scheffer H, et al. The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T > G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**:1174–1177.
- 46 Song GG, Bae SC, Lee YH. Associations between functional TNFR2 196 M/R polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2014; **34**:1529–1537.
- 47 Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; **31**:315–324.
- 48 Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996; **39**:34–40.
- 49 Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K. SNP\_tools: a compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC Res Notes* 2009; **2**:214.
- 50 Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; **22**:1928–1929.
- 51 Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; **296**:2225–2229.
- 52 Liu C, Batliwalla F, Li W, Lee A, Roubenoff R, Beckman E, et al. Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2008; **14**:575–581.
- 53 Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C, Tamouza R, Loiseau P, Ravaud P, et al. A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; **67**:478–484.
- 54 Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 2008; **17**:3532–3538.
- 55 Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002; **53**:1020–1027.
- 56 Potter C, Worthington J, Silman A, Barton A. TNFR2 is not associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Caucasian population. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:2579–2581.







**Supplementary Table 1.** Selected SNPs of TNF receptor 2 gene.

Gene_SNP	MAF	Nucleotide substitution	Amino acid substitution/location	Reference
TNFR2_rs3397	0.474	T/C	3'UTR	[1-3]
TNFR2_rs1061622	0.239	T/G	M196R	[2, 4-20]
TNFR2_rs1061624	0.477	G/A	3'UTR	[2]
TNFR2_rs1061631	0.212	G/A	3'UTR	
TNFR2_rs5746026	0.035	G/A	E232K	

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency in Hapmap-CEU; UTR, untranslated region.

**References:**

1. Bayley, J.P., et al., *Association of polymorphisms of the tumour necrosis factor receptors I and II and rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(8): p. 969-71.
2. Medrano, L.M., et al., *Role of TNFRSF1B polymorphisms in the response of Crohn's disease patients to infliximab*. Hum Immunol, 2014. **75**(1): p. 71-5.
3. Puga, I., et al., *A polymorphism in the 3' untranslated region of the gene for tumor necrosis factor receptor 2 modulates reporter gene expression*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2210-20.
4. Arlestig, L., et al., *Polymorphism of genes related to cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(6): p. 866-71.
5. Barton, A., et al., *Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(1): p. 61-5.
6. Bridges, S.L., Jr., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes: definition of novel haplotypes and racial/ethnic differences*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(8): p. 2045-50.
7. Constantin, A., et al., *Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 742-7.
8. Dahlqvist, S.R., et al., *Tumor necrosis factor receptor type II (exon 6) and interleukin-6 (-174) gene polymorphisms are not associated with family history but tumor necrosis factor receptor type II is associated with hypertension in patients with rheumatoid arthritis from northern Sweden*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(11): p. 3096-8.
9. Fabris, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2002. **29**(9): p. 1847-50.
10. Ghelani, A.M., et al., *Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians of East Midlands in the United Kingdom*. Rheumatol Int, 2011. **31**(10): p. 1355-61.
11. Glossop, J.R., et al., *Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(6): p. R1227-34.
12. Goeb, V., et al., *Association between the TNFR2 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p. R1056-62.
13. Ongaro, A., et al., *Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T>G polymorphism predict the response grading to anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis?* Rheumatol Int, 2008. **28**(9): p. 901-8.
14. Potter, C., et al., *TNFR2 is not associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Caucasian population*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2579-81.
15. Rooryck, C., et al., *Influence of FCGR3A-V212F and TNFRSF1B-M196R genotypes in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab therapy*. Clin Exp Rheumatol, 2008. **26**(2): p. 340-2.
16. Song, G.G., S.C. Bae, and Y.H. Lee, *Associations between functional TNFR2 196 M/R polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Rheumatol Int, 2014.
17. Toonen, E.J., et al., *The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T>G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(8): p. 1174-7.
18. van der Helm-van Mil, A.H., et al., *No association between tumour necrosis factor receptor type 2 gene polymorphism and rheumatoid arthritis severity: a comparison of the extremes of phenotypes*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(10): p. 1232-4.
19. Vasilopoulos, Y., et al., *Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFR2 susceptibility variant with anti-TNF-alpha response in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(4): p. 701-4.
20. Till, A., et al., *The Met-196 -> Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5994-6004.

**Supplementary Table 2.** Meta-analysis for the TNFR2<sub>rs1061622</sub> polymorphism and risk of developing RA.

Fixed effects ( Mantel-Haenszel ) meta-analysis			Polymorphism : rs1061622 (M196R)		
			Genetic model : RR+MR vs. MM (dominant)		
Authors	PMID	Population	RA(A/a)	Control(A/a)	OR ( 95% CI )
Arlestig L	18173921	Sweden	189/278	292/377	0.878 (0.691, 1.116)
Dahlqvist SR	12428254	Sweden	70/99	69/114	1.168 (0.762, 1.792)
Fabris M	12233877	Italy	68/107	27/57	1.342 (0.774, 2.325)
Ghelani AM	20401725	UK	85/42	72/68	1.911 (1.163, 3.14)
Potter C	16059898	UK	79/101	59/71	0.941 (0.598, 1.482)
Barton A	11212177	UK	136/104	63/74	1.536 (1.007, 2.342)
Plenge RM	16380915	Sweden	624/834	381/472	0.927 (0.782, 1.099)
Canet LM	-	European	475/851	403/732	1.014 (0.859, 1.196)

Fixed effects ( Mantel-Haenszel ) meta-analysis			Polymorphism : rs1061622 (M196R)		
			Genetic model : RR vs. MM+MR (recessive)		
Authors	PMID	Population	RA(A/a)	Control(A/a)	OR ( 95% CI )
Arlestig L	18173921	Sweden	30/437	45/624	0.952 (0.59, 1.535)
Dahlqvist SR	12428254	Sweden	10/159	8/175	1.376 (0.53, 3.572)
Fabris M	12233877	Italy	8/167	1/83	3.976 (0.489, 32.323)
Ghelani AM	20401725	UK	18/109	7/133	3.138 (1.264, 7.787)
Potter C	16059898	UK	8/172	5/125	1.163 (0.372, 3.639)
Barton A	11212177	UK	29/211	7/130	2.552 (1.087, 5.995)
Plenge RM	16380915	Sweden	84/1374	61/792	0.794 (0.564, 1.116)
Canet LM	-	European	66/1260	54/1081	1.049 (0.725, 1.516)

Dominant model:

Summary OR (Mantel-Haenszel)=1.02 95%CI (0.929-1.121), *P*-value=0.6743.

Test of heterogeneity:

(1) Cochran Q test: Q=13.95, df=7, *P*-value=0.0521.

(2) Woolf's test:  $X^2 = 13.95$ , df = 7, *P*-value = 0.0521.

(3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI]=49.82% [0%-77.59%].

Recessive model:

Summary OR (Mantel-Haenszel)=1.09 95%CI (0.898-1.333), *P*-value=0.3706.

Test of heterogeneity:

(1) Cochran Q test: Q=14.41, df=7, *P*-value=0.0444.

(2) Woolf's test:  $X^2 = 14.41$ , df = 7, *P*-value = 0.0454.

(3)  $I^2$  statistic:  $I^2$  [95% CI]=51.42% [0%-78.23%].

**Supplementary Table 3.** Meta-analysis for the TNFR2<sub>rs1061622</sub> polymorphism and anti-TNF drug response.

<b>Fixed effects ( Mantel-Haenszel ) meta-analysis</b>					
<b>Polymorphism : rs1061622 (M196R)</b>					
<b>Genetic model : GG+TG vs. TT (dominant)</b>					
<i>Authors</i>	<i>PMID</i>	<i>Population</i>	<i>RA(A/a)</i>	<i>Control(A/a)</i>	<i>OR ( 95% CI )</i>
Rooryck C	18565259	French	18/16	5/12	2.7 (0.78, 9.347)
Vasilopoulos Y	21813066	Greek	19/12	35/34	1.538 (0.649, 3.646)
Toonen EJ	18385279	European	28/32	24/27	1.938 (0.862, 4.354)
Canet LM	-	European	56/84	69/129	1.246 (0.797, 1.949)

<b>Fixed effects ( Mantel-Haenszel ) meta-analysis</b>					
<b>Polymorphism : rs1061622 (M196R)</b>					
<b>Genetic model : GG vs. TT+TG (recessive)</b>					
<i>Authors</i>	<i>PMID</i>	<i>Population</i>	<i>RA(A/a)</i>	<i>Control(A/a)</i>	<i>OR ( 95% CI )</i>
Rooryck C	18565259	French	2/32	1/16	1 (0.084, 11.874)
Vasilopoulos Y	21813066	Greek	1/30	4/65	0.542 (0.058, 5.056)
Toonen EJ	18385279	European	5/55	5/46	0.836 (0.228, 3.069)
Canet LM	-	European	9/131	6/192	2.198 (0.764, 6.324)

Dominant model:

Summary OR ( Mantel-Haenszel ) = 1.303, 95% CI (0.932, 1.823) , P-value = 0.1221

Test of heterogeneity:

- (1) Cochran Q test: Q=2.04, df=3, P-value=0.5637.
- (2) Woolf's test: X<sup>2</sup> = 2.04, df = 3, P-value = 0.5638
- (3) I<sup>2</sup> statistic: I<sup>2</sup> [95% CI]=0.0% [0%-73.09%].

Recessive model:

Summary OR ( Mantel-Haenszel ) = 1.276, 95% CI (0.624, 2.609) , P-value = 0.5039

Test of heterogeneity:

- (1) Cochran Q test: Q=2.03, df=3, P-value=0.5669.
- (2) Woolf's test: X<sup>2</sup> = 2.03, df = 3, P-value = 0.5672.
- (3) I<sup>2</sup> statistic: I<sup>2</sup> [95% CI]=0.0% [0%-72.89%].

# *Artículo cuarto*

---



***ARTÍCULO EN REVISIÓN***

## ***Variants in steroid hormone-related genes influence the risk of developing rheumatoid arthritis and response to anti-TNF therapy: a multicenter study and meta-analysis***

---

***Introducción y objetivos:*** La AR es un enfermedad crónica caracterizada por una inflamación persistente de la membrana sinovial que conduce a la destrucción progresiva de las articulaciones afectadas y que puede llegar a afectar incluso a tejidos extra-articulares dando lugar a un amplio rango de complicaciones severas. Aunque la etiología de la AR es en gran medida desconocida, existen evidencias que sugieren que las hormonas esteroides pueden estar implicadas en el proceso de cronificación de la respuesta inmune inflamatoria que origina la AR y determinar el grado de progresión de la enfermedad. En base a estas evidencias y asumiendo el componente genético que subyace a la AR, el objetivo del presente estudio fue analizar si la presencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes relacionados con el transporte, la señalización y el metabolismo de las hormonas esteroides puede influir sobre el riesgo de desarrollar AR y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Además, evaluamos si el genotipado de los SNPs seleccionados nos podía ayudar a predecir con certeza el grado de respuesta de los pacientes a la terapia con biológicos anti-TNF $\alpha$ .

***Materiales y métodos:*** Diseñamos un estudio retrospectivo y multicéntrico que incluía 2579 individuos, 1360 pacientes caucásicos de AR y 1219 controles sanos. Los pacientes con AR fueron diagnosticados en base a los criterios establecidos por el ACR y el EULAR. Seleccionamos 47 SNPs en 16 genes relacionados con el metabolismo, transporte y señalización de los estrógenos y se genotiparon mediante sondas KASPar<sup>®</sup> (LGC Genomics). Los análisis de asociación se llevaron a cabo mediante regresión logística ajustando por edad, sexo y país de origen y el valor de significación estadística se estableció en 0,0003 de acuerdo al método Meff para el análisis de múltiples comparaciones. Además, realizamos análisis estratificados por factor reumatoide y anti-CCP para evaluar el efecto de estos factores sobre las asociaciones observadas con el riesgo de AR. Finalmente, mediante regresión logística y considerando los criterios de respuesta del EULAR y los cambios en deltaDAS28 (3 ó 6 meses), evaluamos la asociación de los SNPs seleccionados con la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$ . Los datos potencialmente interesantes fueron confirmados mediante un meta-análisis con los datos de un GWAS previamente publicado (n=882; DREAM registry) y asumiendo un modelo de efectos aleatorios y un modelo de herencia log-aditivo.

***Resultados:*** Los resultados mostraron que los individuos que portaban el genotipo *CYP3A4*<sub>rs11773597C/C</sub> presentaban un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR que aquellos que eran portadores del alelo más común (OR=3,74, IC 95% 1,61-8,66; P=0,002). Aunque la presencia de factor reumatoide no modificaba significativamente el efecto de esta variante sobre el riesgo de AR, observamos que la asociación era más fuerte en pacientes seronegativos que en seropositivos (OR=5,93, IC 95% 2,31-15,2; P=0,0002 vs. OR=2,43, IC 95% 0,88-6,75; P=0,10) y que la asociación en pacientes seronegativos permanecía significativa tras la corrección por múltiples comparaciones. Este dato sugería que el gen *CYP3A4* o un haplotipo más extenso conteniendo la variante *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> podría modular la expresión de *CYP3A4* o de algún gen cercano y, por tanto, influir sobre el riesgo de desarrollar AR a través de la modulación de los niveles de metabolitos hormonales. En apoyo de esta hipótesis, observamos que el polimorfismo *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> correlacionaba con los niveles de expresión de *TRIM4* que está implicado en la modulación de los niveles hormonales. Además de estos interesantes datos, nuestro estudio mostró que polimorfismos en los genes *CYP1B1*, *ESR2*, *GSTP1* y *NR1I2* tenían un efecto muy notable sobre la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR=0,65-1,82) que permitía predecir con un nivel de certeza razonable el grado de respuesta de los pacientes (AUC=0,694 vs. AUC=0,607,  $P_{LR}=8,89 \cdot 10^{-07}$  y  $P_{50.000perm}=5,72 \cdot 10^{-09}$ ). Aunque la asociación de 18 SNPs con los cambios en DAS28

no pudo ser confirmada por la carencia de datos en el GWAS realizado en el contexto del registro DREAM, el meta-análisis confirmó la asociación de los polimorfismos *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *PGR*<sub>rs518162</sub> con mayores cambios en DAS28 ( $P=0,012$ ,  $I^2=0,0\%$  y  $P=0,011$ ,  $I^2=0,0\%$ ). En línea con estos datos, observamos además una fuerte correlación positiva entre los SNPs de la región 3'UTR del gen *ESR2* (*ESR2*<sub>rs928554</sub>, *ESR2*<sub>rs4986938</sub> y *ESR2*<sub>rs1255998</sub>) y la expresión de su ARNm ( $P=2,55 \cdot 10^{-2}$ - $2,82 \cdot 10^{-26}$ ) así como el impacto funcional del SNP *PGR*<sub>rs518162</sub> para modificar el sitio de unión de dos factores de transcripción (DMRT7 y RREB-1) y modular la regulación de las histonas en células madres mesenquimales derivadas de condrocitos. El meta-análisis con los datos del GWAS no nos permitió evaluar asociaciones potencialmente interesantes para polimorfismos en *CYP1B1*, *CYP2C9*, *GSPT1* y *SULT1A1*. Esperamos poder validar estas asociaciones en estudios posteriores de nuestro grupo.

Conclusiones: Estos datos apuntan a un impacto moderado del SNP *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> sobre el riesgo de AR y ponen de manifiesto la importancia de los polimorfismos en los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *ESR2*, *GSPT1*, *NR1I2*, *PGR* y *SULT1A1* en la modulación y predicción de la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ .





1 **Polymorphisms in steroid hormone signalling, phase I- and II-**  
2 **metabolizing enzyme and hormone transporter genes are associated**  
3 **with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to**  
4 **anti-TNF therapy: a multicenter study and meta-analysis**  
5

6 Luz M. Canet<sup>1,2</sup>, Rafael Cáliz MD, PhD<sup>1,2</sup>, Carmen B. Lupiañez<sup>1</sup>, Helena Canhão MD, PhD<sup>3,4</sup>,  
7 Manuel Martínez-Bueno PhD<sup>5</sup>, Alejandro Escudero MD, PhD<sup>6</sup>, Jose M. Sánchez-Maldonado<sup>1</sup>, Juana  
8 Segura-Catena<sup>1</sup>, María José Soto-Pino<sup>2</sup>, Miguel A. Ferrer MD, PhD<sup>2</sup>, Antonio García MD, PhD<sup>2</sup>,  
9 Ileana Filipescu MD, PhD<sup>7</sup>, Eva Pérez-Pampin MD, PhD<sup>8</sup>, Alfonso González-Utrilla MD, PhD<sup>2</sup>,  
10 Miguel Ángel López Nevot MD, PhD<sup>9</sup>, Salvatore De Vita MD, PhD<sup>10</sup>, Eduardo Collantes-Estevez  
11 MD, PhD<sup>6</sup>, Luca Quartuccio MD, PhD<sup>10</sup>, Federico Canzian PhD<sup>11</sup>,  
12 Marieke Coenen PhD<sup>12</sup>, João E. Fonseca MD, PhD<sup>3,4</sup>, Juan Sainz PhD<sup>1,2</sup>  
13  
14

15 <sup>1</sup> Genomic Oncology Area, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of  
16 Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain

17 <sup>2</sup> Rheumatology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

18 <sup>3</sup> Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidades  
19 de Lisboa, Lisbon, Portugal and Rheumatology Department, Hospital de Santa Maria, Lisbon Academic  
20 Medical Centre

21 <sup>4</sup> Rheumatology department, Santa Maria Hospital–CHLN, Lisbon, Portugal

22 <sup>5</sup> Area of Genomic Medicine, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of  
23 Granada / Andalusian Regional Government, Granada, Spain

24 <sup>6</sup> Rheumatology department, Reina Sofía Hospital/IMIBIC/University of Córdoba, Córdoba, Spain

25 <sup>7</sup> Rheumatology department, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Romania

26 <sup>8</sup> Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

27 <sup>9</sup> Immunology department. Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

28 <sup>10</sup> Department of Medical and Biological Sciences, Clinic of Rheumatology, University of Udine, Italy.

29 <sup>11</sup> Genomic Epidemiology Group, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

30 <sup>12</sup> Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands.  
31  
32  
33

34 Running title: Estrogen-related variants and RA risk and drug response

35 Key Words: Estrogen-related polymorphisms; genetic variants; susceptibility; rheumatoid arthritis;  
36 drug response; anti-TNF drugs  
37  
38

39 Corresponding author:

40 Juan Sainz, PhD

41 Genomic Oncology Area

42 GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada /

43 Andalusian Regional Government

44 PTS Granada

45 Avda. de la Ilustración, 114

46 18016 Granada, Spain  
47

48 Phone: +34-958-715500

49 Fax: +34-958-637071

50 E-mail: [juan.sainz@genyo.es](mailto:juan.sainz@genyo.es)  
51

52 Word Count: Abstract 283, Text 3778, 6 Tables, 2 Figures and 8 Supplementary Tables or Figures.

53 **ABSTRACT**

54 Sex steroid hormones may influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) and disease  
55 progression. Here, we evaluated whether 47 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in steroid  
56 hormone-related genes are associated with the risk of RA and anti-TNF drug response in a  
57 population of 1360 RA patients and 1219 controls. We found an overall significant association of  
58 the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> SNP with RA risk (OR=3.74) and a strong correlation of this variant with  
59 increased *TRIM4* mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells ( $P=2.01\cdot 10^{-35}$ ).  
60 Most importantly, we also found a noticeable impact of SNPs or haplotypes within the *CYP1B1*,  
61 *ESR2*, *GSTP1*, and *NR1I2* loci on clinical response to anti-TNF drugs (OR=0.49-1.82) that  
62 significantly improved the ability to predict drug response (AUC=0.694 vs. AUC=0.607;  
63  $P_{LR}=8.87\cdot 10^{-07}$  and  $P_{50.000perm}=5.72\cdot 10^{-09}$ ). In addition, although there was a partial overlapping  
64 between our data and those from the Dutch DREAM registry (n=882) that limited our capability  
65 to validate most of the potentially interesting associations, the meta-analysis of both cohorts  
66 confirmed the association of the *ESR2*<sub>rs1255998</sub> and *PGR*<sub>rs518162</sub> SNPs with large changes in  
67 DAS28 after treatment with anti-TNF drugs ( $P=0.012$ ,  $f^2=0.0\%$ ,  $P_{Het}=0.49$  and  $P=0.011$ ,  $f^2=0.0\%$ ,  
68  $P_{Het}=0.48$ , respectively). Interestingly, we also observed a positive correlation between the  
69 *ESR2*<sub>rs928554</sub>, *ESR2*<sub>rs4986938</sub> and *ESR2*<sub>rs1255998</sub> SNPs and *ESR2* mRNA expression levels (ranging  
70 from  $P=2.55\cdot 10^{-2}$  to  $2.82\cdot 10^{-26}$ ) and a functional impact of the *PGR*<sub>rs518162</sub> SNP to change binding  
71 motifs for 2 regulatory transcription factors (DMRT7 and RREB-1) and to modulate histone  
72 regulation in mesenchymal stem cells derived from chondrocytes. These data point towards a  
73 moderate impact of the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> SNP on the risk of RA but highlight the implication of  
74 *CYP1B1*, *ESR2*, *GSTP1*, *NR1I2* and *PGR* variants in modulating and predicting the response to  
75 anti-TNF medications.

76

77

78

79

80 **Keywords:** Steroid hormone-related SNPs; risk; rheumatoid arthritis; anti-TNF drug response.

## 81 INTRODUCTION

82 Rheumatoid arthritis (RA) is an immune mediated chronic inflammatory disease characterized  
83 by persistent inflammation of synovial membrane that leads to progressive joint destruction,  
84 cartilage degradation, bone erosion and damage in extra-articular tissues <sup>1,2</sup>. Although the  
85 etiology of RA remains unclear, there are some evidences suggesting a role of sex steroid  
86 hormones in determining the onset and disease progression <sup>3</sup>. Women are more prone to have  
87 RA than men and show more severe symptoms and faster disease progression <sup>4</sup>. Women with  
88 RA also experience a sudden worsening of symptoms with the estrogen withdrawal at  
89 menopause, whereas the enhancement of female sex hormone levels during pregnancy <sup>5</sup> and  
90 estrogen replacement therapy or the continuous use of oral contraceptives often leads to a  
91 reduction in disease activity <sup>6,7</sup>. Experimental and human studies have also demonstrated that  
92 sex steroid hormones may contribute to susceptibility to RA by influencing both innate and  
93 adaptive immune responses <sup>3,8</sup>. In this regard, it has been described that the administration of  
94 estrogens impairs the recruitment of antigen presenting cells and their interaction with T-cells,  
95 suppresses the production of pro-inflammatory cytokines <sup>9-11</sup>, and inhibits Th<sub>1</sub>- and Th<sub>17</sub>-  
96 mediated immune functions <sup>12,13</sup>. Estrogens also stimulate Treg cell development <sup>14,15</sup> and the  
97 release of anti-inflammatory cytokines (*IL10*, *IL4* and *TGFβ*) <sup>11</sup> that may result in the activation  
98 of Th<sub>2</sub>-mediated immune responses. Recent studies have demonstrated that these estrogen-  
99 mediated anti-inflammatory effects could be reversed by administration of estrogen receptor  
100 blockers <sup>16</sup>, which suggests a role of estrogens and their receptors in the modulation of the  
101 immune function and, consequently, the susceptibility to RA and drug response.

102  
103 Despite this suggestive background, it is still not clear whether single nucleotide polymorphisms  
104 (SNPs) within steroid hormone signalling, phase I- and II-metabolizing enzyme and hormone  
105 transporter genes may confer susceptibility to RA <sup>17-19</sup> and affect drug response <sup>20</sup>. Hence, we  
106 decided to conduct a comprehensive case-control study to comprehensively investigate whether  
107 47 potentially functional SNPs in steroid hormone-related gene are associated with the risk of

108 developing RA and response to anti-TNF drugs and whether genotyping of these variants could  
109 be useful to predict with confidence drug response.

110

## 111 **MATERIAL AND METHODS**

### 112 *Study population*

113 The population consisted of 2579 participants, 1360 RA patients and 1219 healthy controls. All  
114 participants were Caucasian and gave their written informed consent to participate in the study,  
115 which was approved by the ethical review committee of participant institutions. All RA patients  
116 were treated from January 2004 to January 2014 and they fulfilled the 1987 revised American  
117 College of Rheumatology (ACR) criteria <sup>21</sup> and the more recently published ACR/EULAR  
118 classification criteria <sup>22</sup>. A detailed description of the population has been reported elsewhere <sup>23</sup>  
119 and additional information on the sample ascertainment is also displayed in Supplementary  
120 Table 1 and Supplementary material.

121

### 122 *Response to anti-TNF medications*

123 Five hundred and forty-eight RA patients treated with anti-TNF therapies (infliximab, etanercept,  
124 or adalimumab) were classified in response categories according to the EULAR response  
125 criteria <sup>22</sup>: “good responders” (n=187), “moderate responders” (n=228) and “non-responders”  
126 (n=133). Only anti-TNF-naïve patients with a minimum follow-up of at least 6 months after  
127 introduction of the current anti-TNF treatment were included and patients with missing values for  
128 Disease Activity Score-28 (DAS28) at baseline or at 6 months were excluded. Logistic  
129 regression analyses adjusted for age, sex and country of origin were performed to evaluate the  
130 effect of selected variants on anti-TNF drug response. In order to avoid analytical biases, we  
131 firstly performed the analysis comparing “good responders” vs. “non-responders” (excluding  
132 “moderate responders”) and, subsequently, we also carried out an analysis grouping “moderate  
133 responders” with “non-responders”. Finally, linear regression analyses adjusted for age, sex and  
134 country of origin and using changes in DAS28 after six months of treatment as outcome were

135 also performed to further assess the association of selected SNPs with response to anti-TNF  
136 therapies.

137

### 138 *SNP selection and genotyping*

139 Forty-seven potentially functional SNPs within steroid hormone signaling, phase I- and II-  
140 metabolizing enzyme and hormone transporter genes were selected to genotype the study  
141 population (Table 1). Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells  
142 (PBMCs) using the Qiagen Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Genotyping of the selected  
143 polymorphisms was carried out using KASPar® assays (LGC Genomics KBioscience, London,  
144 UK) in a 384-well plate format (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to  
145 manufacture's instructions. Additional details are included as Supplementary material.

146

### 147 *Replication population*

148 For replication purposes, we used data from a previously genome-wide association study  
149 (GWAS) on drug response conducted in eight hundred and eighty-two Dutch RA patients  
150 ascertained from the DREAM (Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring) registry, a large  
151 population coordinated by the DREAM Society (Netherlands). Further details about the DREAM  
152 registry have been published elsewhere<sup>24</sup>. Ethical approval for the DREAM registry and written  
153 informed consent of each subject was also obtained. Clinical and drug response information  
154 (changes in DAS28 at three months) were prospectively gathered from the medical records.

155

### 156 *Statistical analysis*

157 The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test was performed in the control group by a standard  
158 observed-expected chi-square ( $\chi^2$ ). Logistic and linear regression analysis adjusted for age, sex  
159 and country of origin was used to assess the main effects of the selected SNPs on RA risk and  
160 drug response. Subsequent analysis considering rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated  
161 protein antibodies (ACPA) status as additional covariates for adjustment were also performed to  
162 further assess whether these factors influenced on the reported associations with the risk of the



163 disease or drug response to anti-TNF drugs. A RF-stratified analysis was also performed to  
164 assess whether the associations observed were of similar magnitude in RF<sup>+</sup> and RF<sup>-</sup> patients.  
165 Statistical power was estimated using Quanto software (<http://hydra.usc.edu/gxe/>).

166  
167 Correction for multiple testing was used to rule out the possibility of detecting false positive  
168 associations. We calculated an adjusted significance level using the Meff method<sup>25</sup> but also  
169 considering the number of inheritance models tested (codominant, dominant, recessive and log-  
170 additive). Thus, the threshold used for the main effect and drug response analysis was 0.0003  
171 ( $[0.05]/41$  independent genetic markers)/4 inheritance models).

172

### 173 *Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis*

174 In addition to the analysis based on single SNPs, we performed haplotype frequency estimation  
175 and haplotype association analysis adjusted for age, sex and center using haplogit package in  
176 STATA (v.12; dominant model). Haplotype frequencies were determined using the Expectation-  
177 maximization (EM) algorithm and the most common haplotype was set as the reference  
178 whereas the minimum haplotype frequency was set at 0.01, therefore assessing association for  
179 common haplotypes. Haplotype for each locus was reconstructed using SNPtool  
180 ([http://www.dkfz.de/de/molgen\\_epidemiology/tools/SNPtool.html](http://www.dkfz.de/de/molgen_epidemiology/tools/SNPtool.html)) and haploview (v.4.1) and  
181 block structures were determined according to the method of Gabriel *et al.*<sup>26</sup> and were  
182 graphically displayed using  $r^2$  values.

183

### 184 *Meta-analyses with previously published GWAS*

185 In order to confirm the association of selected SNPs with the response to anti-TNF drugs, we  
186 conducted meta-analyses of our data with those from a previously published GWAS<sup>24,27</sup>. The  $I^2$   
187 statistic was used to assess heterogeneity between studies and the pooled OR was computed  
188 using the random-effect model (assuming that between-study variation might depend on chance  
189 or random variation and an individual study effect). Random-effects models are more  
190 conservative than fixed-effects models and give rise to wider confident intervals (CI), which

191 ensures the reliability of the results even though the data come from studies with a relatively  
192 different design.

193

#### 194 *Population admixture*

195 Given the multicenter nature of our study and the chance of having population admixture that  
196 might lead to spurious associations, we decided to evaluate whether the association estimates  
197 for all selected SNPs were different across countries. For that, we performed a meta-analysis  
198 assuming a dominant model of inheritance and a random-effect model.  $I^2$  statistic was used to  
199 assess heterogeneity of selected SNPs.

200

#### 201 *In silico functional analysis*

202 Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) and ENCODE  
203 annotation data (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) were used to predict the functional role of  
204 those SNPs considered as potentially interesting.

205

#### 206 *eQTL analysis*

207 We also assessed whether any of the polymorphisms associated either with RA risk or drug  
208 response correlated with mRNA expression levels in the publicly available eQTL browsers for  
209 PBMCs (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/> and <http://www.gtexportal.org/home/>)<sup>28-30</sup>, or  
210 tissues (lymphocyte cell line, adipose and skin; [http://www.sanger.ac.uk/science/tools/genevar-](http://www.sanger.ac.uk/science/tools/genevar-gene-expression-variation-archive)  
211 [gene-expression-variation-archive](http://www.sanger.ac.uk/science/tools/genevar-gene-expression-variation-archive)).

212

#### 213 *Predictive models and discriminative accuracy*

214 Finally, we also assessed the value of steroid hormone-related polymorphisms for prediction of  
215 anti-TNF drug response using stepwise logistic and Cox regression analyses. We built a model  
216 including age, sex and RF along with those genetic polymorphisms that showed significant  
217 associations with anti-TNF drug response in the single-SNP analysis ( $P<0.05$ ). Then, using p-  
218 values and linkage disequilibrium ( $r^2$ ) as selection criteria (Supplementary Figure 1), we

219 dropped variables that have the highest p-value and we stopped when all variables were  
220 significant defined by  $P < 0.10$ . Reconstructed LD blocks were also considered to avoid  
221 redundant signals. The area under the curve (AUC) of a receiver operating characteristic (ROC)  
222 curve analysis was used to assess the discriminative accuracy of this particular model  
223 compared with a reference model including age, sex and RF as covariates. A -2 log likelihood  
224 ratio (LR) test was used to determine whether the predictive model including genetic information  
225 fitted significantly better the data compared to the reference model. Finally, we run a  
226 randomization test to confirm whether the improved predictive ability of the model including  
227 genetic variants was consistent after 50.000 iterations. Further details are included in  
228 supplementary material. All tests were conducted using the statistical software SPSS (SPSS  
229 Inc., Chicago, USA) and STATA (v.12, StataCorp, College Station, TX) for MAC and R software  
230 (<http://www.r-project.org/>).

231

## 232 RESULTS

233 A total of 1360 RA patients and 1229 healthy controls were included in this multicenter study.  
234 RA patients were slightly older than controls ( $60.50 \pm 13.04$  vs.  $55.62 \pm 9.11$ , respectively;  $P < 0.05$ )  
235 and showed a significantly higher female/male ratio ( $1102/258 = 4.27$  vs.  $680/539 = 1.26$ ,  
236 respectively;  $P < 0.001$ ). A total of 548 patients received anti-TNF therapy (infliximab, etanercept  
237 or adalimumab) as first biologic treatment. Demographic and clinical characteristics of RA  
238 patients and those treated with anti-TNF drugs as first biologic are displayed in Table 2 and  
239 Supplementary Table 2.

240

241 All SNPs were in Hardy Weinberg Equilibrium ( $P < 0.001$ ). Logistic regression analysis showed  
242 overall and/or RF-specific associations for SNPs within the *ABCB1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*,  
243 *CYP3A4*, *ESR1*, *GSTP1*, *PGR* and *SULT1A1* genes with the risk of developing RA (OR=1.26-  
244 3.74; Table 3 and Supplementary Table 3). The most relevant effect on RA risk was observed  
245 for the *CYP3A4*<sub>rs11773597C/C</sub> genotype that was associated with an almost 4-fold increased risk of  
246 developing the disease (OR=3.74,  $P = 0.0016$ ; Table 3). Haplotype analysis also revealed that

247 the *CYP3A4*<sub>GG</sub> haplotype (not including the *CYP3A4*<sub>rs11773597C</sub> allele) was also associated with  
248 an increased risk of developing RA (OR=1.43,  $P=0.009$ ; Supplementary Table 4). Interestingly,  
249 we also found that the *CYP3A4*<sub>rs11773597C</sub> allele strongly correlated with *TRIM4* mRNA expression  
250 levels in PBMCs ( $P=2.01 \cdot 10^{-35}$ , Z-score=12.42, FDR=0.00) and mapped among enhancer  
251 histone marks in 5 tissues. Although it would have been interesting to validate the association of  
252 the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> SNP with the risk of RA through a meta-analysis with publicly available data  
253 of a recent GWAS meta-analysis<sup>27</sup>, no genetic information according to a recessive model of  
254 inheritance was available.

255

256 Next, we also decided to assess whether selected polymorphisms had a role in modulating the  
257 response to anti-TNF drugs and whether these genetic variants could help to improve the ability  
258 to predict treatment response. We found that patients carrying the *ESR2*<sub>rs4986938T</sub>, *ESR2*<sub>rs1271572A</sub>  
259 and *NR1I2*<sub>rs1464603C</sub> alleles or the *ESR2*<sub>rs1255998C/C</sub> genotype had an increased chance of having a  
260 poor response to anti-TNF drugs (OR=1.75-2.54) whereas patients harbouring the *GSTP1*<sub>rs1695G</sub>  
261 allele or the *CYP1B1*<sub>rs1056836C/C</sub> genotype had a significantly decreased chance of having a poor  
262 response to anti-TNF drugs (OR=0.48 and 0.51, Table 4 and Supplementary Table 5).  
263 Interestingly, we also found that, according to a log-additive model, carriers of the *ESR2*<sub>rs1255998C</sub>  
264 allele showed a significantly poorer response to anti-TNF medications (per-allele OR=2.62,  
265  $P=0.001$ ) whereas carriers of the *GSTP1*<sub>rs1695G</sub> allele had a decreased chance of treatment  
266 failure (per-allele OR=0.56,  $P=0.003$ ). These results suggest an allele-dosage effect for these  
267 variants to modulate the response to anti-TNF medications. Importantly, all these associations  
268 were confirmed when moderate and non-responders were grouped. Furthermore, although the  
269 association of the above-mentioned SNPs with drug response remained marginally significant  
270 after correction for multiple testing (OR=1.73-2.62 and OR=0.57, respectively), we observed  
271 that the *ESR2*<sub>GCC</sub> (not including the alleles associated with poor response) or the *GSTP1*<sub>TG</sub>  
272 (including the allele associated with good response) haplotypes were associated with a  
273 decreased risk of poor response ( $P=0.001$  and  $P=0.003$ , respectively; Supplementary Table 6).  
274 These results suggested that the effect attributed to the *ESR2* and *GSTP1* loci on response to



303 In addition to these findings, it has been demonstrated that the *ESR2*<sub>rs1255998</sub> SNP influences the  
304 *ESR2* mRNA expression levels whereas the *PGR*<sub>rs518162</sub> SNP maps among promoter and  
305 enhancer histone marks in a wide variety of tissues and changes binding motifs for 2 regulatory  
306 transcription factors (DMRT7 and RREB-1). Furthermore, the *PGR*<sub>rs518162</sub> SNP was predicted to  
307 alter binding of POL2, FOXA1, GATA3, TAF1, TBP and EGR1 proteins, which are key  
308 transcription activators involved in the modulation of a wide range of biological processes such  
309 as control of immune responses<sup>32</sup>, ESR-chromatin interactions<sup>33</sup> and, most importantly, ESR-  
310 dependent effects on drug response<sup>34</sup>.

311  
312 Finally, we analyzed whether those SNPs that were associated with response to anti-TNF could  
313 be useful to predict with confidence drug response. To do that, we performed Cox regression  
314 and ROC curve analyses that gave rise to a model including 5 genetic variants significantly  
315 associated with response to anti-TNF treatment that together with demographic (age and sex)  
316 and clinical variables (RF) substantially improved the capacity to predict the response to anti-  
317 TNF drugs compared with the reference model including only demographic and clinical  
318 variables (AUC=0.694, 95%CI 0.673-0.751 vs. AUC=0.607, 95%CI 0.545-0.669;  $P_{LR}$   
319  $_{test}=8.89 \cdot 10^{-07}$ ; Table 5 and Figure 3). The consistency of this predictive analysis was confirmed  
320 through a 50.000 permutation test that showed that none of the 50.000 permuted models  
321 showed a better prediction capacity than our genetic model (Z score=5.70 and  $P_{Z\_score-}$   
322  $_{value\_}(50.000perm)=5.72 \cdot 10^{-09}$ ; Supplementary material).

323  
324 **DISCUSSION**  
325 Data from this large candidate gene association study showed that the *ABCB1*<sub>rs1045642</sub>,  
326 *CYP2C19*<sub>rs4244285</sub>, *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub>, and *PGR*<sub>rs518162</sub> polymorphisms were associated with an  
327 increased risk of developing RA whereas the *CYP2C9*<sub>rs1057910</sub> SNP was associated with a  
328 decreased risk of developing the disease. The most relevant effect was observed for the  
329 *CYP3A4*<sub>rs11773597C/C</sub> genotype that was associated with an increased risk of developing RA. In  
330 addition, a RF-stratified analysis revealed that the effect of this variant on RA risk was stronger

331 in seronegative patients than in those patients showing RF positivity. The association of the  
332 *CYP3A4*<sub>rs11773597C/C</sub> genotype with RA risk in seronegative patients remained statistically  
333 significant after correction for multiple testing, which suggested at least a modest role of the  
334 *CYP3A4* locus in modulating the risk of RA. We also found a significant association of the  
335 *CYP3A4*<sub>GG</sub> haplotype with an increased risk of RA. Although this haplotype did not include the  
336 *CYP3A4*<sub>rs11773597C</sub> allele and its association with RA risk did not remain significant after  
337 correction for multiple testing, we hypothesize that the presence of this polymorphism or a large  
338 haplotype encompassing the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> and *CYP3A4*<sub>rs2740574</sub> SNPs might contribute to RA  
339 susceptibility since *CYP3A4* gene is clustered along with other CYP3A genes (*CYP3A5*,  
340 *CYP3A7* and *CYP3A43*) in a short region of 0.2 Mb on the chromosome 7q21 and encodes one  
341 of the most abundant enzymes catalyzing the oxidation of endogenous and exogenous sex  
342 steroid hormones but also of a broad variety of structurally unrelated compounds<sup>35</sup>. Considering  
343 our data, we hypothesize that the polymorphisms within the 5'-UTR region of the *CYP3A4* gene  
344 or a specific haplotype including this variant might modulate gene expression of the *CYP3A4* or  
345 a nearby gene and, therefore, influence on the risk of developing RA through the modulation of  
346 steroid hormone metabolite levels and, consequently, the activity of certain immune-related  
347 pathways. In support of this hypothesis, we found that the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> SNP strongly  
348 correlated with *TRIM4* mRNA expression levels suggesting that this polymorphism might  
349 influence the risk of developing RA by modulating the *TRIM4*-dependent activities on immune  
350 system. Interestingly, a recent GWAS meta-analysis has identified *TRIM4* as a gene involved in  
351 the modulation of steroid hormone levels<sup>36</sup> whereas experimental studies have suggested that  
352 its overexpression induces the activation of the NFκB and IFN pathways. However, although  
353 tempting, we cannot ensure that the *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> SNP is a causative variant and, therefore,  
354 we think that fine mapping of this region and a better characterization of the functional role of  
355 the *CYP3A4* variants or haplotypes is needed to identify the causative variant/s underlying the  
356 observed effect.

357



358 These interesting results encouraged us to evaluate whether selected SNPs had an effect on  
359 the response to anti-TNF medications and, more importantly, whether they could be used to  
360 improve the prediction of response to anti-TNF drugs. Interestingly, we found significant  
361 associations with poor response to anti-TNF treatments for SNPs within *CYP1B1*, *ESR2*,  
362 *GSTP1* and *NR1I2* genes. The most relevant effect was found for SNPs within the *ESR2* and  
363 *GSTP1* genes. The association of the *ESR2*<sub>rs1255998</sub> and *ESR2*<sub>rs4986938</sub> SNPs according to  
364 dominant or log-additive models remained marginally significant after correction for multiple  
365 testing. Importantly, haplotype analysis also revealed a marginally significant association of the  
366 *ESR2*<sub>GCCCT</sub> and *GSTP1*<sub>TG</sub> haplotypes with a decreased chance of having poor response to anti-  
367 TNF drugs that was confirmed when “moderate” and “non-responders” were grouped. Most  
368 importantly, the meta-analysis of the linear regression results of our population with those from  
369 the DREAM registry confirmed that the *ESR2*<sub>rs1255998</sub> but also the *PGR*<sub>rs518162</sub> polymorphisms  
370 negatively impacted response to anti-TNF drugs. These results along with those reporting a  
371 strong correlation of the *ESR2* 3'-UTR polymorphisms with *ESR2* mRNA expression<sup>30</sup> and the  
372 active role of the *PGR*<sub>rs518162</sub> SNP to alter binding of POL2, FOXA1, GATA3, TAF1, TBP and  
373 EGR1 proteins emphasizes the involvement of these loci in determining the response to anti-  
374 TNF drugs likely through the modulation of immune responses by estrogen-dependent  
375 mechanisms<sup>33,34</sup>. Unfortunately, although we also attempted to replicate the association of the  
376 *GSTP1*<sub>rs1695</sub> SNP with a decreased risk of having poor response to anti-TNF blockers, no  
377 information for this marker was available in the DREAM registry.

378  
379 *ESR2* and *PGR* genes are located on chromosome 14q23.2 and 11q22-q23 and they encode  
380 the estrogen receptor beta (ESR $\beta$  or ESR2) and the progesterone receptor (PGR) that are  
381 receptors highly expressed in synovial cells<sup>37</sup> and bone<sup>38</sup> but also in most of the immune cells  
382<sup>39</sup>. A number of observational studies have suggested that estrogens are joint protective and  
383 that their excess, regulated by progesterone, contributes to maintain bone marrow density<sup>40,41</sup>  
384 and protects against RA<sup>5,42</sup>. Likewise, it has been also reported that the withdrawal of both  
385 estrogen and progesterone increases the incidence of RA<sup>43-45</sup> and its severity<sup>46</sup>. Several

386 experimental studies have demonstrated that estrogens are involved in controlling both Th<sub>1</sub>- and  
387 Th<sub>2</sub>-mediated immune responses in RA (either directly through estrogen response elements  
388 (EREs) or indirectly through interaction of ESR2 with other transcription factors such as NFκB  
389 and AP1)<sup>47</sup> whereas progesterone promotes a switch for Th1 to Th2-type immune responses.  
390 Estrogens modulate a wide variety of immune mechanisms including thymocyte maturation <sup>48</sup>,  
391 cell trafficking <sup>49</sup>, B and T cell proliferation <sup>50</sup> and expression of specific adhesion molecules <sup>50</sup>.  
392 In addition, estrogen is able to stimulate B cell activity by suppressing T cell-mediated immune  
393 responses and inhibiting autoreactive B-cell apoptosis <sup>51</sup> but also the promotion of Th2-  
394 mediated immune responses <sup>52</sup> and the inhibition of Th<sub>17</sub> cells <sup>53</sup>, which are key players in  
395 determining both systemic and tissue-specific autoimmunity <sup>54</sup>. Previous animal studies have  
396 demonstrated that ovariectomized (OVX) mice have increased incidence and severity of  
397 collagen-induced arthritis (CIA) and that the administration of exogenous estrogen or  
398 progesterone quickly induces disease attenuation by reducing the number of IL17-producing  
399 cells and neutrophils in joints <sup>53</sup>. With this background, we hypothesize that polymorphisms  
400 within the *ESR2* and *PGR* loci, along with those included in *CYP1B1*, *NNR1I2* and *GSTP1*  
401 genes, may modulate estrogen-mediated immune responses, thereby influencing on the  
402 response to anti-TNF drugs.

403

404 In order to further test this hypothesis, we compared the prediction ability of a model including  
405 genetic variants significantly associated with drug response with that one of a reference model  
406 including only demographic and clinical covariates. Our results showed that the addition of 5  
407 estrogen-related polymorphisms to the reference model showed a substantially improved ability  
408 to predict the response to anti-TNF medications. The AUC for the genetic model was ~9%  
409 higher in comparison with the AUC of the reference model, empathizing the importance of  
410 considering polymorphisms in steroid hormone signalling, phase I- and II-metabolizing enzyme  
411 and hormone transporter genes to predict the response to anti-TNF medications. Given the lack  
412 of precise clinical markers to foresee the response to anti-TNF medications, the considerable  
413 predictive value of these SNPs, if validated, along with those SNPs already identified as

414 associated with response to anti-TNF blockers at genome-wide level <sup>24,55-59</sup> might be of help to  
415 personalise treatment strategies for RA.

416

## 417 **CONCLUSIONS**

418 These results suggest that genetic variants within sex steroid hormone-related genes may  
419 influence the risk of RA and response to anti-TNF medications and that genotyping of these  
420 variants can be used to predict drug response and to contribute to individual risk stratification.

421

## 422 **COMPETING INTERESTS**

423 The authors declare they have no competing financial interests.

424

## 425 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

426 RC and JS designed the study and drafted the manuscript. LMC, and CBL were responsible for  
427 genotyping. MM-B and JS did the statistical data analysis, HC, AE, JSM, JSC, MAF, IF, EPP,  
428 AG, AGU, MALN, SDV, EC, LQ and JEF coordinated the sample collection and HC, IF and  
429 MJSP were involved in the records review and data acquisition. All authors contributed to, seen,  
430 and approved the final version of the manuscript.

431

## 432 **ACKNOWLEDGMENTS**

433 We thank all participants who have agreed to participate in this study. Authors also thank María  
434 Dolores Casares, Ángeles Molina and Carmen Oloriz for sample collection and technical  
435 support. This study was supported by grants from FIBAO foundation (Granada, Spain).

436

## 437 **REFERENCES**

- 438 1 Scott, D. L., Wolfe, F. & Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376**, 1094-1108.
- 439 2 Boissier, M. C., Semerano, L., Challal, S., Saldenber-Kermanac'h, N. & Falgarone, G.  
440 Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun.*

- 441 3 Hughes, G. C. & Choubey, D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by  
442 oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 740-751 (2014).
- 443 4 Kvien, T. K., Uhlig, T., Odegard, S. & Heiberg, M. S. Epidemiological aspects of  
444 rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Ann N Y Acad Sci* **1069**, 212-222 (2006).
- 445 5 Barrett, J. H., Brennan, P., Fiddler, M. & Silman, A. J. Does rheumatoid arthritis remit  
446 during pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the  
447 United Kingdom performed prospectively from late pregnancy. *Arthritis Rheum* **42**, 1219-  
448 1227 (1999).
- 449 6 Salliot, C., Bombardier, C., Saraux, A., Combe, B. & Dougados, M. Hormonal  
450 replacement therapy may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry  
451 HLA-DRB1 \*01 and/or \*04 alleles by protecting against the production of anti-CCP:  
452 results from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis* **69**, 1683-1686 (2010).
- 453 7 Doran, M. F., Crowson, C. S., O'Fallon, W. M. & Gabriel, S. E. The effect of oral  
454 contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a  
455 population based study. *J Rheumatol* **31**, 207-213 (2004).
- 456 8 Yamasaki, D., Enokida, M., Okano, T., Hagino, H. & Teshima, R. Effects of ovariectomy  
457 and estrogen replacement therapy on arthritis and bone mineral density in rats with  
458 collagen-induced arthritis. *Bone* **28**, 634-640 (2001).
- 459 9 Rachon, D., Mysliwska, J., Suchecka-Rachon, K., Wieckiewicz, J. & Mysliwski, A.  
460 Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood  
461 mononuclear cells of postmenopausal women. *J Endocrinol* **172**, 387-395 (2002).
- 462 10 Pfeilschifter, J., Koditz, R., Pfohl, M. & Schatz, H. Changes in proinflammatory cytokine  
463 activity after menopause. *Endocr Rev* **23**, 90-119 (2002).
- 464 11 Salem, M. L. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated  
465 inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug*  
466 *Targets Inflamm Allergy* **3**, 97-104 (2004).

- 467 12 Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C. & Li, D. J. Estrogen enhances the functions of  
468 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and  
469 bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* **8**, 50-58 (2011).
- 470 13 Lelu, K. *et al.* Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for  
471 estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against  
472 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **187**, 2386-2393 (2011).
- 473 14 Prieto, G. A. & Rosenstein, Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human  
474 CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* **118**, 58-65  
475 (2006).
- 476 15 Tai, P. *et al.* Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol*  
477 **214**, 456-464 (2008).
- 478 16 Dulos, J. *et al.* Suppression of the inflammatory response in experimental arthritis is  
479 mediated via estrogen receptor alpha but not estrogen receptor beta. *Arthritis Res Ther*  
480 **12**, R101 (2010).
- 481 17 Sato, H. *et al.* Association of Rsa polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with  
482 rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **32**, 2143-2148 (2012).
- 483 18 Dziejko, V. *et al.* Oestrogen receptor polymorphisms in female patients with  
484 rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* **40**, 329-333 (2011).
- 485 19 Karlson, E. W. *et al.* A prospective study of androgen levels, hormone-related genes and  
486 risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **11**, R97 (2009).
- 487 20 Pawlik, A. *et al.* Effect of ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis  
488 treatment with methotrexate. *Pharmacol Rep* **64**, 185-190 (2012).
- 489 21 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the  
490 classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-324 (1988).
- 491 22 van Gestel, A. M. *et al.* Development and validation of the European League Against  
492 Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary  
493 American College of Rheumatology and the World Health Organization/International  
494 League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* **39**, 34-40 (1996).

- 495 23 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to  
496 rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study.  
497 *Pharmacogenet Genomics* (2015).
- 498 24 Umicevic Mirkov, M. *et al.* Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response  
499 in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **72**, 1375-1381 (2013).
- 500 25 Nyholt, D. R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms  
501 in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* **74**, 765-769 (2004).
- 502 26 Gabriel, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*  
503 **296**, 2225-2229 (2002).
- 504 27 Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug  
505 discovery. *Nature* **506**, 376-381 (2014).
- 506 28 Westra, H. J. *et al.* Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known  
507 disease associations. *Nat Genet* **45**, 1238-1243 (2013).
- 508 29 Consortium, G. T. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot  
509 analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* **348**, 648-660 (2015).
- 510 30 Lappalainen, T. *et al.* Transcriptome and genome sequencing uncovers functional  
511 variation in humans. *Nature* **501**, 506-511 (2013).
- 512 31 Heinzen, E. L. *et al.* Tissue-specific genetic control of splicing: implications for the study  
513 of complex traits. *PLoS Biol* **6**, e1 (2008).
- 514 32 Wan, Y. Y. GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol* **35**,  
515 233-242 (2014).
- 516 33 Theodorou, V., Stark, R., Menon, S. & Carroll, J. S. GATA3 acts upstream of FOXA1 in  
517 mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. *Genome Res* **23**, 12-22  
518 (2013).
- 519 34 Ross-Innes, C. S. *et al.* Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical  
520 outcome in breast cancer. *Nature* **481**, 389-393 (2012).
- 521 35 Niwa, T. *et al.* Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to  
522 regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica* **28**, 539-547 (1998).



523 36 Zhai, G. *et al.* Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels  
524 suggest a key role in ageing mechanisms. *PLoS Genet* **7**, e1002025 (2011).

525 37 Cutolo, M. *et al.* Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of  
526 human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 820-827 (1996).

527 38 Bord, S., Horner, A., Beavan, S. & Compston, J. Estrogen receptors alpha and beta are  
528 differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2309-  
529 2314 (2001).

530 39 Cutolo, M. *et al.* Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes  
531 and CD8+, CD29+, CD45RO+ T lymphocytes in normal and rheumatoid synovium.  
532 *Arthritis Rheum* **36**, 1087-1097 (1993).

533 40 Recker, R. R., Davies, K. M., Dowd, R. M. & Heaney, R. P. The effect of low-dose  
534 continuous estrogen and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in  
535 elderly women. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **130**, 897-904 (1999).

536 41 Turner, R. T. Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* **14**,  
537 187-191 (1999).

538 42 Ostensen, M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus  
539 erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* **876**, 131-143; discussion 144 (1999).

540 43 Goemaere, S. *et al.* Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and  
541 menopausal transition. *J Rheumatol* **17**, 1620-1622 (1990).

542 44 Merlino, L. A., Cerhan, J. R., Criswell, L. A., Mikuls, T. R. & Saag, K. G. Estrogen and  
543 other female reproductive risk factors are not strongly associated with the development  
544 of rheumatoid arthritis in elderly women. *Semin Arthritis Rheum* **33**, 72-82 (2003).

545 45 Wilder, R. L. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of  
546 rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* **44**, 10-12 (1996).

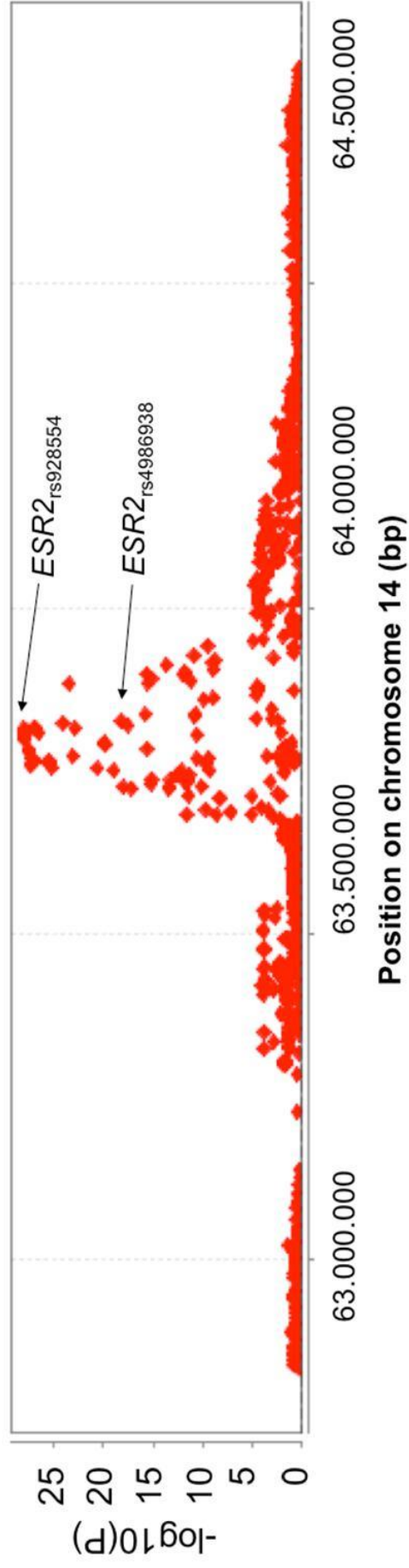
547 46 Kuiper, S. *et al.* Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early  
548 rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **28**, 1809-1816 (2001).

549 47 Kovats, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell*  
550 *Immunol* **294**, 63-69 (2015).

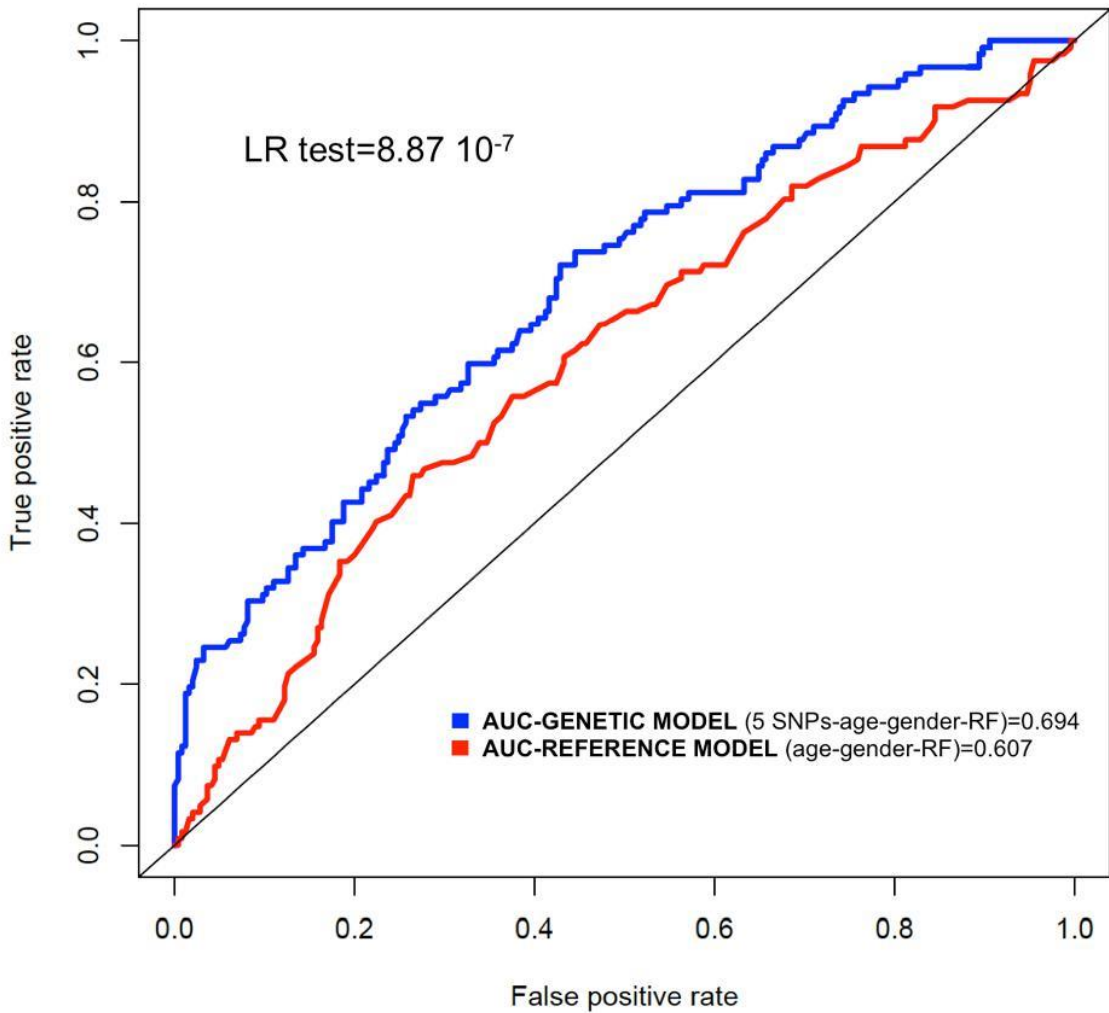
- 551 48 Erlandsson, M. C., Ohlsson, C., Gustafsson, J. A. & Carlsten, H. Role of oestrogen  
552 receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated  
553 effects on thymus. *Immunology* **103**, 17-25 (2001).
- 554 49 Mo, R. *et al.* Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J*  
555 *Immunol* **174**, 6023-6029 (2005).
- 556 50 Da Silva, J. A. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system.  
557 *Ann N Y Acad Sci* **876**, 102-117; discussion 117-108 (1999).
- 558 51 Medina, K. L., Strasser, A. & Kincade, P. W. Estrogen influences the differentiation,  
559 proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood* **95**, 2059-2067 (2000).
- 560 52 Beagley, K. W. & Gockel, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the  
561 female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**,  
562 13-22 (2003).
- 563 53 Andersson, A. *et al.* Estrogen regulates T helper 17 phenotype and localization in  
564 experimental autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther* **17**, 32 (2015).
- 565 54 Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and  
566 autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-350 (2007).
- 567 55 Liu, C. *et al.* Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms  
568 associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol*  
569 *Med* **14**, 575-581 (2008).
- 570 56 Acosta-Colman, I. *et al.* GWAS replication study confirms the association of PDE3A-  
571 SLCO1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*  
572 **14**, 727-734 (2013).
- 573 57 Plant, D. *et al.* Replication of association of the PTPRC gene with response to anti-tumor  
574 necrosis factor therapy in a large UK cohort. *Arthritis Rheum* **64**, 665-670 (2012).
- 575 58 Cui, J. *et al.* Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to  
576 anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum* **62**, 1849-1861 (2010).

577 59 Plant, D. *et al.* Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor  
578 necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with  
579 polymorphisms at seven loci. *Arthritis Rheum* **63**, 645-653 (2011).  
580  
581

**Figure 1.** *ESR2* expression according to the *ESR2* SNPs in a lymphoblastoid cell line.



**Figure 2.** Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis.



ROC curves summarize the accuracy of prediction for each particular model. The model including SNPs significantly associated with response to anti-TNF drugs and demographic and clinical variables (marked in blue) showed a significantly improved predictive capacity compared with a reference model including only age, gender and RF as covariates (marked in red). AUC=0.694 vs. AUC=0.607.

**Table 1.** Selected SNPs of hormone receptors and transporters as well as phase I- and II-metabolizing enzymes.

<b>Gene</b>	<b>Chr.</b>	<b>dbSNP rs#</b>	<b>Nucleotide substitution</b>	<b>Effect-allele</b>	<b>Amino acid substitution</b>
<i>ABCB1</i>	7	rs1045642	T/C	T	I1145I
<i>ABCB1</i>	7	rs1922242	A/T	A	intronic
<i>ABCB1</i>	7	rs2229109	T/C	T	S400N
<i>ABCB1</i>	7	rs1202168	C/T	T	intronic
<i>ABCB1</i>	7	rs9282564	T/C	T	N21D
<i>ABCB1</i>	7	rs2214102	T/C	T	5'-UTR
<i>CYP1A1</i>	15	rs1799814	A/C	A	T461N
<i>CYP1A2</i>	15	rs762551	A/C	A	intronic
<i>CYP1B1</i>	2	rs1800440	T/C	T	N453T
<i>CYP1B1</i>	2	rs1056836	C/G	C	L432V
<i>CYP1B1</i>	2	rs10012	C/G	G	R48G
<i>CYP2C9</i>	10	rs1799853	C/T	T	R144C
<i>CYP2C9</i>	10	rs1057910	A/C	A	I359L
<i>CYP2C19</i>	10	rs12248560	C/T	T	Near gene
<i>CYP2C19</i>	10	rs4244285	A/G	A	P227P
<i>CYP3A4</i>	7	rs2740574	T/C	T	Near gene
<i>CYP3A4</i>	7	rs11773597	C/G	C	Near gene
<i>CYP17A1</i>	10	rs743572	A/G	G	5'-UTR
<i>ESR1</i>	6	rs851984	G/A	A	intronic
<i>ESR1</i>	6	rs2881766	G/T	T	intronic
<i>ESR1</i>	6	rs2071454	G/T	G	5'-UTR
<i>ESR1</i>	6	rs2077647	A/G	G	S10S
<i>ESR1</i>	6	rs827421	G/A	A	intronic
<i>ESR1</i>	6	rs2234693	C/T	C	Intronic
<i>ESR1</i>	6	rs9340799	A/G	A	intronic
<i>ESR1</i>	6	rs1801132	C/G	G	P325P
<i>ESR1</i>	6	rs3798577	C/T	T	3' UTR
<i>ESR1</i>	6	rs910416	C/T	T	Near gene
<i>ESR2</i>	14	rs1255998	C/G	C	3' UTR
<i>ESR2</i>	14	rs928554	T/C	T	3' UTR
<i>ESR2</i>	14	rs4986938	T/C	T	3' UTR
<i>ESR2</i>	14	rs1271572	C/A	A	Near gene
<i>GSTP1</i>	11	rs1695	A/G	G	I105V
<i>GSTP1</i>	11	rs1138272	C/T	T	A114V
<i>HSD17B1</i>	17	rs605059	C/T	T	G313S
<i>NR1I2</i>	3	rs2276706	A/G	A	Near gene
<i>NR1I2</i>	3	rs1464603	C/T	C	intronic
<i>NR1I2</i>	3	rs6785049	A/G	G	intronic
<i>NR1I2</i>	3	rs2276707	C/T	T	intronic
<i>NR1I2</i>	3	rs1054191	A/G	A	3' UTR
<i>NR1I2</i>	3	rs3814057	A/C	C	3' UTR
<i>PGR</i>	11	rs1042838	C/A	A	V660L
<i>PGR</i>	11	rs1379130	A/G	A	G393G
<i>PGR</i>	11	rs10895068	A/G	A	5'-UTR
<i>PGR</i>	11	rs518162	A/G	A	5'-UTR
<i>SHBG</i>	17	rs6259	A/G	A	D356N
<i>SULT1A1</i>	16	rs9282861	A/G	A	R213H

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency; UTR, untranslated region.



**Table 2.** Demographic and clinical characteristics of RA patients.

<b>RA patient population</b>	
<b>Demographic characteristics</b>	<i>Overall (n=1360)</i>
<i>Age (years)</i>	60.50 ± 13.04
<b>Clinical assessment</b>	
<i>RF positive patients</i>	708 (69.8)
<i>ACPA positive patients*</i>	566 (70.9)
<i>Current DAS28</i>	3.77 ± 1.30
<b>Treatments</b>	
<i>DMARDs</i>	
<i>Methotrexate</i>	812 (59.70)
<i>Leflunomide</i>	324 (23.82)
<i>Sulphasalazine</i>	181 (13.31)
<i>Biologic agents</i>	
<i>Infliximab</i>	372 (27.35)
<i>Etanercept</i>	224 (16.47)
<i>Adalimumab</i>	190 (13.97)
<i>Golimumab</i>	16 (1.18)
<i>Rituximab</i>	13 (0.96)
<i>Tocilizumab</i>	6 (0.44)
<i>Abatacept</i>	5 (0.37)
<i>Number of biologic agents</i>	
<i>0</i>	520 (38.23)
<i>1</i>	339 (24.93)
<i>2</i>	183 (13.46)
<i>3</i>	161 (11.84)
<i>4</i>	103 (7.57)
<i>&gt;4</i>	86 (6.32)

Data are means ± standard deviation or n (%).

Abbreviations: RF, rheumatoid factor; ACPA: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs.

\* RF and ACPA data was available for 1014 and 831 patients, respectively.

**Table 3.** Overall association of estrogen-related polymorphisms and risk of RA.

Gene	SNP ID	Effect-allele	Overall (n=2579)		RF-positive patients (n=1927)		RF-negative patients (n=1526)	
			OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value
<i>ABCB1</i>	rs1045642	T	<b>1.26 (1.03-1.55)</b>	<b>0.024</b>	1.16 (0.92-1.47)	0.21	1.37 (1.00-1.87)	<b>0.046</b>
<i>CYP17A1</i>	rs743572	G	1.18 (0.93-1.48) <sup>§</sup>	0.17	1.08 (0.82-1.42) <sup>§</sup>	0.56	<b>1.43 (1.03-1.98)<sup>§</sup></b>	<b>0.030</b>
<i>CYP1A1</i>	rs1799814	A	1.33 (0.97-1.81)	0.073	1.20 (0.83-1.74)	0.33	<b>1.57 (1.03-2.40)<sup>²</sup></b>	<b>0.042</b>
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	A	<b>1.26 (1.02-1.56)<sup>²</sup></b>	<b>0.031</b>	1.16 (0.91-1.49)	0.24	1.28 (0.94-1.75)	0.12
<i>CYP2C19</i>	rs12248560	T	1.14 (0.70-1.84) <sup>§</sup>	0.61	0.90 (0.49-1.66) <sup>§</sup>	0.74	<b>1.83 (1.01-3.32)<sup>§</sup></b>	<b>0.046</b>
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	A	<b>1.34 (1.02-1.77)<sup>§</sup></b>	<b>0.037</b>	<b>1.41 (1.02-1.96)<sup>§²</sup></b>	<b>0.040</b>	1.20 (0.80-1.80) <sup>§</sup>	0.37
<i>CYP3A4</i>	rs11773597	C	<b>3.74 (1.61-8.66)<sup>§²</sup></b>	<b>0.002</b>	2.43 (0.88-6.75) <sup>§</sup>	0.10	<b>5.93 (2.31-15.2)<sup>§²</sup></b>	<b>0.0002</b>
<i>ESR1</i>	rs3798577	T	0.88 (0.71-1.09)	0.24	1.01 (0.78-1.31)	0.94	<b>0.64 (0.48-0.86)<sup>²</sup></b>	<b>0.003</b>
<i>GSTP1</i>	rs1695	G	1.11 (0.92-1.33)	0.28	<b>1.29 (1.04-1.59)<sup>²</sup></b>	<b>0.021</b>	0.87 (0.67-1.14)	0.31
<i>PGR</i>	rs518162	A	<b>1.28 (1.01-1.62)</b>	<b>0.044</b>	1.15 (0.87-1.52)	0.33	1.39 (0.98-1.96)	0.065
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	A	1.17 (0.98-1.41)	0.087	<b>1.36 (1.10-1.69)<sup>²</sup></b>	<b>0.0047</b>	0.95 (0.73-1.24)	0.71

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval. Estimates were adjusted for age, sex, and country of origin. P<0.05 in bold.

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.

<sup>§</sup> Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.

<sup>²</sup> Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance.

<sup>²</sup>*CYP2C19*<sub>rs4244285</sub> (per-allele OR<sub>Overall</sub> = 1.27, 95%CI 1.05-1.53; *P*<sub>trend</sub>=0.013).

<sup>²</sup>*CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> (per-allele OR<sub>Overall</sub> = 1.28, 95%CI 1.02-1.60; *P*<sub>trend</sub>=0.033).

<sup>²</sup>*CYP2C19*<sub>rs1057910</sub> (per-allele OR<sub>RF-Positive</sub> = 1.39, 95%CI 1.02-1.91; *P*<sub>trend</sub>=0.038).

<sup>²</sup>*GSTP1*<sub>rs1695</sub> (per-allele OR<sub>RF-Positive</sub> = 1.22, 95%CI 1.04-1.43; *P*<sub>trend</sub>=0.015).

<sup>²</sup>*SULT1A1*<sub>rs9282861</sub> (per-allele OR<sub>RF-Positive</sub> = 1.29, 95%CI 1.09-1.52; *P*<sub>trend</sub>=0.0032).

<sup>²</sup>*CYP1A1*<sub>rs1799814</sub> (per-allele OR<sub>RF-Negative</sub> = 1.54, 95%CI 1.03-2.30; *P*<sub>trend</sub>=0.035).

<sup>²</sup>*CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> (per-allele OR<sub>RF-Negative</sub> = 1.43, 95%CI 1.05-1.94; *P*<sub>trend</sub>=0.023).

<sup>²</sup>*ESR2*<sub>rs3798577</sub> (per-allele OR<sub>RF-Negative</sub> = 0.81, 95%CI 0.67-0.97; *P*<sub>trend</sub>=0.020).

**Table 4.** Overall association of estrogen-related polymorphisms and response to anti-TNF drugs (EULAR response criteria).

Gene	SNP ID	Effect-allele	R vs. NR (n=320)		R vs. NR+MR (n=548)	
			OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value
<i>CYP1B1</i>	rs1056836	C	<b>0.48 (0.27-0.86)<sup>§</sup></b>	<b>0.014</b>	<b>0.65 (0.42-0.98)<sup>§</sup></b>	<b>0.042</b>
<i>CYP2C9</i>	rs1799853	T	1.30 (0.77-2.18)	0.32	1.49 (0.99-2.24) <sup>‡</sup>	0.058
<i>ESR2</i>	rs1255998	C	<b>2.54 (1.40-4.62)<sup>§‡</sup></b>	<b>0.002</b>	<b>1.81 (1.18-2.79)<sup>§‡</sup></b>	<b>0.007</b>
<i>ESR2</i>	rs4986938	T	<b>2.12 (1.26-3.58)<sup>‡</sup></b>	<b>0.005</b>	<b>1.73 (1.16-2.56)<sup>‡</sup></b>	<b>0.007</b>
<i>ESR2</i>	rs1271572	T	<b>1.75 (1.04-2.94)</b>	<b>0.033</b>	<b>1.58 (1.06-2.36)</b>	<b>0.023</b>
<i>GSTP1</i>	rs1695	G	<b>0.51 (0.31-0.84)<sup>‡</sup></b>	<b>0.008</b>	<b>0.57 (0.38-0.84)<sup>‡</sup></b>	<b>0.004</b>
<i>GSTP1</i>	rs1138272	T	0.53 (0.25-1.13)	0.10	<b>0.49 (0.28-0.87)<sup>‡</sup></b>	<b>0.015</b>
<i>NR1I2</i>	rs1464603	C	<b>1.95 (1.19-3.18)</b>	<b>0.008</b>	<b>1.82 (1.25-2.66)</b>	<b>0.002</b>
<i>NR1I2</i>	rs2276707	T	1.68 (1.00-2.84)	0.052	<b>1.55 (1.02-2.35)</b>	<b>0.038</b>
<i>NR1I2</i>	rs3814057	C	1.62 (0.97-2.71)	0.067	<b>1.52 (1.02-2.28)</b>	<b>0.042</b>

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; R, responder; MR, moderate responder; NR, non-responder; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model and adjusted for age, sex and country of origin.

<sup>§</sup> Estimates calculated according to a recessive model and adjusted for age, sex and country of origin.

<sup>‡</sup> Estimates calculated according to a log-additive model and adjusted for age, sex and country of origin.

P<0.05 in bold.

<sup>‡</sup>*GSTP1*<sub>rs1695</sub> (per-allele OR<sub>NR vs R</sub> = 0.56, 95%CI 0.38-0.82; *P*<sub>trend</sub>=0.003).

<sup>‡</sup>*ESR2*<sub>rs1255998</sub> (per-allele OR<sub>NR vs R</sub> = 2.62, 95%CI 1.52-4.53; *P*<sub>trend</sub>=0.001).

<sup>‡</sup>*ESR2*<sub>rs4986938</sub> (per-allele OR<sub>NR vs R</sub> = 1.55, 95%CI 1.09-2.20; *P*<sub>trend</sub>=0.014).

<sup>‡</sup>*GSTP1*<sub>rs1138272</sub> (per-allele OR<sub>NR+MR vs R</sub> = 0.56, 95%CI 0.33-0.94; *P*<sub>trend</sub>=0.028).

<sup>‡</sup>*GSTP1*<sub>rs1695</sub> (per-allele OR<sub>NR+MR vs R</sub> = 0.68, 95%CI 0.51-0.90; *P*<sub>trend</sub>=0.007).

<sup>‡</sup>*ESR2*<sub>rs1255998</sub> (per-allele OR<sub>NR+MR vs R</sub> = 1.78, 95%CI 1.22-2.59; *P*<sub>trend</sub>=0.002).

<sup>‡</sup>*ESR2*<sub>rs4986938</sub> (per-allele OR<sub>NR+MR vs R</sub> = 1.38, 95%CI 1.05-1.81; *P*<sub>trend</sub>=0.023).

<sup>‡</sup>*CYP2C9*<sub>rs1799853</sub> (per-allele OR<sub>NR+MR vs R</sub> = 1.49, 95%CI 1.04-2.14; *P*<sub>trend</sub>=0.030).

**Table 5.** Meta-analysis for the association of estrogen-related polymorphisms and relative change of DAS28 score ( $\Delta$ DAS28).

Gene	SNP ID	Chr.	Effect-allele	Discovery population (n=548)		Replication (GWAS-DREAM) (n=882)		Meta-analysis (n=1430)	
				OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>a</sup>	P-value
<i>ABCB1</i>	rs1045642	7	T	1.01 (0.86-1.20)	0.88	ND	ND	ND	ND
<i>ABCB1</i>	rs1922242	7	A	1.11 (0.94-1.32)	0.21	0.98 (0.88-1.08) *	0.67	1.02 (0.91-1.15)	0.70
<i>ABCB1</i>	rs2229109	7	T	0.74 (0.51-1.07)	0.11	1.09 (0.77-1.54) *	0.63	0.90 (0.62-1.32)	0.60
<i>ABCB1</i>	rs1202168	7	T	1.07 (0.90-1.27)	0.43	ND	ND	ND	ND
<i>ABCB1</i>	rs9282564	7	T	0.94 (0.51-1.72)	0.83	0.89 (0.72-1.10)	0.29	0.90 (0.73-1.09)	0.28
<i>ABCB1</i>	rs2214102	7	T	NA (NA-NA)	NA	0.96 (0.80-1.15)	0.63	ND	ND
<i>CYP1A1</i>	rs1799814	15	A	<b>1.66 (1.19-2.34)</b>	<b>0.003</b>	ND	ND	ND	ND
<i>CYP1A2</i>	rs762551	15	A	0.95 (0.79-1.14)	0.57	0.95 (0.85-1.05) *	0.32	0.95 (0.87-1.04)	0.27
<i>CYP1B1</i>	rs1800440	2	T	0.96 (0.78-1.18)	0.68	0.98 (0.85-1.13)	0.78	0.97 (0.87-1.10)	0.65
<i>CYP1B1</i> §	rs1056836	2	C	<b>1.34 (1.02-1.76)</b>	<b>0.032</b>	ND	ND	ND	ND
<i>CYP1B1</i>	rs10012	2	G	1.16 (0.96-1.39)	0.12	1.01 (0.90-1.14) *	0.83	1.06 (0.93-1.21)	0.37
<i>CYP2C9</i> §	rs1799853	10	T	<b>0.30 (0.15-0.63)</b>	<b>0.001</b>	ND	ND	ND	ND
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	10	A	0.92 (0.63-1.34)	0.67	1.08 (0.90-1.31)	0.42	1.05 (0.88-1.24)	0.60
<i>CYP2C19</i>	rs12248560	10	T	1.21 (0.99-1.50)	0.068	1.01 (0.89-1.13) *	0.93	1.08 (0.91-1.29)	0.37
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	10	A	1.06 (0.84-1.34)	0.63	1.01 (0.88-1.16) *	0.88	1.02 (0.91-1.15)	0.71
<i>CYP3A4</i>	rs2740574	7	T	0.85 (0.59-1.22)	0.37	0.89 (0.69-1.15) *	0.37	0.88 (0.71-1.08)	0.22
<i>CYP3A4</i>	rs11773597	7	C	<b>1.43 (1.10-1.86)</b>	<b>0.008</b>	<b>0.81 (0.67-0.97) *</b>	<b>0.024</b>	1.07 (0.61-1.86)	0.82
<i>CYP17A1</i>	rs743572	10	G	0.92 (0.77-1.08)	0.30	ND	ND	ND	ND
<i>ESR1</i>	rs851984	6	A	1.03 (0.86-1.23)	0.73	1.09 (0.97-1.22) *	0.16	1.07 (0.97-1.18)	0.16
<i>ESR1</i>	rs2881766	6	T	0.98 (0.79-1.21)	0.82	1.03 (0.90-1.16)	0.70	1.02 (0.91-1.13)	0.77
<i>ESR1</i>	rs2071454	6	G	1.19 (0.91-1.56)	0.20	ND	ND	ND	ND
<i>ESR1</i>	rs2077647	6	G	1.02 (0.86-1.21)	0.86	ND	ND	ND	ND
<i>ESR1</i>	rs827421	6	A	0.95 (0.80-1.13)	0.55	0.93 (0.85-1.03) *	0.16	0.94 (0.86-1.02)	0.12
<i>ESR1</i>	rs2234693	6	C	0.98 (0.83-1.16)	0.81	ND	ND	ND	ND

Tesis doctoral de Luz María Canet Antequera

<i>ESR1</i>	rs9340799	6	A	1.05 (0.88-1.27)	0.53	<b>0.87 (0.79-0.96) *</b>	<b>0.007</b>	0.94 (0.78-1.13)	0.50
<i>ESR1</i>	rs1801132	6	G	1.11 (0.91-1.36)	0.31	<b>0.90 (0.82-0.99) *</b>	<b>0.025</b>	0.98 (0.80-1.20)	0.85
<i>ESR1</i>	rs3798577	6	T	1.03 (0.88-1.22)	0.69	1.01 (0.90-1.13)	0.86	1.02 (0.93-1.12)	0.73
<i>ESR1</i>	rs910416	6	T	0.99 (0.82-1.18)	0.87	0.97 (0.88-1.07) *	0.49	0.97 (0.89-1.06)	0.56
<i>ESR2</i>	rs1255998	14	C	0.90 (0.70-1.44)	0.38	<b>0.81 (0.68-0.95) *</b>	<b>0.0090</b>	<b>0.84 (0.73-0.96)</b>	<b>0.012</b>
<i>ESR2</i>	rs928554	14	T	1.00 (0.84-1.20)	0.98	0.94 (0.85-1.03) *	0.19	0.95 (0.88-1.04)	0.27
<i>ESR2</i>	rs4986938	14	T	0.97 (0.82-1.15)	0.74	0.95 (0.86-1.06) *	0.36	0.96 (0.87-1.04)	0.32
<i>ESR2</i>	rs1271572	14	A	0.95 (0.79-1.14)	0.56	1.07 (0.97-1.18) *	0.16	1.04 (0.93-1.15)	0.52
<i>GSTP1</i>	rs1695	11	G	<b>1.22 (1.02-1.45)</b>	<b>0.033</b>	ND	ND	ND	ND
<i>GSTP1</i> †	rs1138272	11	T	<b>1.55 (1.06-2.27)</b>	<b>0.023</b>	ND	ND	ND	ND
<i>HSD17B1</i>	rs605059	17	T	0.98 (0.83-1.17)	0.86	ND	ND	ND	ND
<i>NR1I2</i>	rs2276706	3	A	1.07 (0.90-1.27)	0.45	0.98 (0.89-1.09) *	0.73	1.00 (0.92-1.09)	0.96
<i>NR1I2</i>	rs1464603	3	C	1.16 (0.96-1.39)	0.12	ND	ND	ND	ND
<i>NR1I2</i>	rs6785049	3	G	1.03 (0.87-1.23)	0.71	ND	ND	ND	ND
<i>NR1I2</i>	rs2276707	3	T	0.94 (0.75-1.19)	0.61	0.93 (0.82-1.06) *	0.31	0.93 (0.83-1.04)	0.22
<i>NR1I2</i>	rs1054191	3	A	1.00 (0.80-1.26)	0.99	1.06 (0.92-1.23) *	0.37	1.04 (0.92-1.18)	0.51
<i>NR1I2</i>	rs3814057	3	C	0.99 (0.78-1.24)	0.90	ND	ND	ND	ND
<i>PGR</i>	rs1042838	11	A	0.97 (0.75-1.25)	0.82	1.13 (0.99-1.29)	0.076	1.09 (0.96-1.24)	0.18
<i>PGR</i>	rs1379130	11	A	1.13 (0.94-1.36)	0.19	ND	ND	ND	ND
<i>PGR</i>	rs10895068	11	A	0.75 (0.50-1.13)	0.17	ND	ND	ND	ND
<i>PGR</i>	rs518162	11	A	<b>0.74 (0.56-0.99)</b>	<b>0.042</b>	0.84 (0.68-1.03)	0.094	<b>0.80 (0.68-0.95)</b>	<b>0.011</b>
<i>SHBG</i>	rs6259	17	A	0.87 (0.66-1.16)	0.35	1.00 (0.86-1.18)	0.96	0.97 (0.84-1.11)	0.64
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	16	A	<b>0.80 (0.67-0.96)</b>	<b>0.017</b>	ND	ND	ND	ND

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>‡</sup> Estimates calculated according to an additive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

<sup>§</sup> Estimates calculated according to a recessive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

<sup>ψ</sup> Genotyped using KASPar® assays (not available through the GWAS)

\* Estimates based on imputed genotypes. P<0.05 in boldface.

**Table 6.** Discriminative value *AUC* for models including estrogen-related variants.

<b>Reference model*</b>			
	P-value	OR 95%CI	AUC 95%CI <sup>a</sup>
Gender	0.1569	1.473 (0.862-2.518)	
Age	0.0084	1.024 (1.006-1.046)	
RF	0.0839	0.637 (0.382-1.062)	0.607 (0.545-0.669) <sup>‡</sup>
<b>Predictive model including 5 SNPs**</b>			
	P-value	OR 95%CI	AUC 95%CI <sup>a</sup>
<i>CYP1B1</i> <sub>rs1056836</sub>	0.0382	1.670 (1.028-2.712)	
<i>ESR2</i> <sub>rs4986938</sub>	9.8E-05	2.823 (1.674-4.759)	
<i>ESR2</i> <sub>rs1271572</sub>	0.0129	1.935 (1.150-3.257)	
<i>GSTP1</i> <sub>rs1695</sub>	0.0103	0.529 (0.325-0.861)	
<i>NR1I2</i> <sub>rs2276707</sub>	0.0017	2.324 (1.372-3.938)	
Gender	0.0667	0.586 (0.331-1.038)	
Age	0.0064	1.027 (1.007-1.047)	
RF	0.0696	0.608 (0.355-1.041)	0.694 (0.673-0.751) <sup>‡</sup>

<sup>a</sup>Including age, gender and rheumatoid factor (RF) as variables never dropped from models and when are compared with a baseline model with AUROC=0.5.

\*Including age, gender and rheumatoid factor as covariates.

\*\*SNPs showing a significant association with response to anti-TNF drugs ( $P < 0.05$ ).

After removing missing values, 367 subjects were available for prediction capacity analysis.

<sup>‡</sup> A LR test showed that the model including genetic variants fitted better the data than the reference model and that the difference in model fit between both models was statistically significant (-2log likelihood ratio test,  $df=5$ ,  $P=8.89E-07$ ).

Residual deviance (Reference model): 456.49

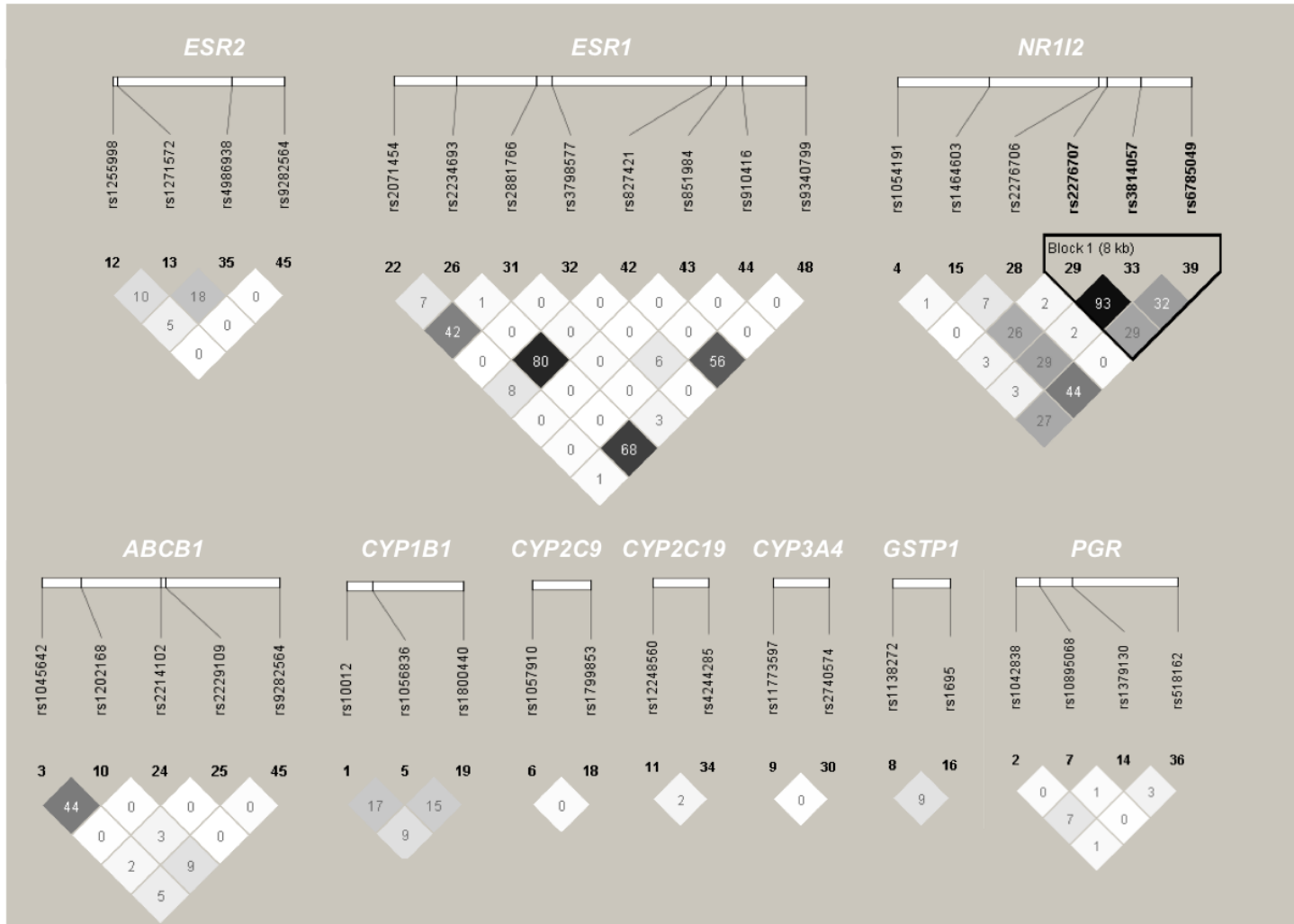
Residual deviance ("Significant SNPs model): 420.34

<sup>‡</sup> A sort analysis revealed that this model showed an AUC value systematically higher than those observed in 50.000 randomized models (Average AUC of null distribution (50.000 models)=0.624; Z score=5.78,  $P_{Z\_score\_value\_ (50.000perm)}=3.70 \cdot 10^{-09}$ ; Supplementary material).





**Supplementary Figure 1.** Linkage disequilibrium (LD) blocks in the hormone-related genes calculated in our population.



Numbers into squares indicate  $r^2$  values (dark color also represents the degree of LD).

## Supplementary data: Methods and Results

### Study population

Five hundred and fifty-three RA patients were recruited from three Spanish medical institutions (Virgen de las Nieves University Hospital, Granada; Reina Sofia Hospital, Córdoba; and University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain) and 924 healthy controls were blood donor subjects randomly recruited at the Regional Blood Transfusion Centre (Granada-Almeria, Spain). Seven hundred and fourteen RA patients and 190 controls were recruited from the Hospital de Santa Maria, Lisbon Academic Medical Centre (Biobanco-IMM, Lisbon Academic Medical Centre, Portugal) whereas ninety-five RA patients and 105 healthy controls were recruited from the Rheumatology Clinic of the University and Pharmacy “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca (Cluj-Napoca, Romania).

### Genotyping

Genotyping was carried out in 384-well plates where DNA samples from RA patients and controls were randomly distributed. KASPar reactions were performed using KASPar assay mix (containing probes) and KASPar kit (2X Reaction Mix and MgCl<sub>2</sub> 50 mM) according to the manufacturer's instructions. PCR products were analyzed with the ABI Prism 7900HT detection system using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). For internal quality control, 5% of samples were randomly selected and included as duplicates. Concordance between the original and the duplicate samples for the 47 SNPs analyzed was always  $\geq 99.0\%$ . All SNPs showed a call rate  $\geq 90.0\%$ .

### Rheumatoid Factor (RF)-stratified analysis: potentially interesting results

A RF-stratified analysis revealed a RF-specific association of the *GSTP1*<sub>rs1695</sub>, *SULT1A1*<sub>rs9282861</sub> and *ESR1*<sub>rs3798577</sub> SNPs with the risk of RA. RF<sup>+</sup> patients carrying the *GSTP1*<sub>rs1695G</sub> and *SULT1A1*<sub>rs9282861A</sub> alleles had an increased risk of developing RA (OR=1.22, 95%CI 1.04-1.43,  $P_{Trend}=0.015$  and OR=1.29, 95%CI 1.09-1.52,  $P_{Trend}=0.0032$ ) whereas no effect was observed in RF<sup>-</sup> subjects (OR=0.94, 95%CI 0.77-1.15,  $P_{Trend}=0.56$  and OR=0.95, 95%CI 0.76-1.18,  $P_{Trend}=0.62$ ; Table 3 and Supplementary Table 3). In addition, RF<sup>-</sup> patients carrying the *ESR1*<sub>rs3798577T</sub> allele showed a decreased risk of RA (OR=0.64, 95%CI 0.48-0.86,  $P=0.003$ ) with no effect in RF<sup>+</sup> patients (OR=1.01, 95%CI 0.78-1.31,  $P=0.94$ ).

### Predictive models and discriminative accuracy: randomization test method

We compared the predictive model including significant SNPs, age, gender and RF (“original” model) with 50,000 “randomized” models in which the effect of SNPs on response to anti-TNF medications was neutralized. The neutralization of procedure was as follows: 1) we randomly reassigned genotypes for according the genotype frequencies observed in controls (“good responders”) and kept unchanged affected status (case/control), sex, age and RF for each particular subject in the data set; 2) we adjust the model with reassigned genotypes including original affected status, sex and age as covariates and; 3) we calculate the AUC for this randomized model. Then, we repeated this three-step process 50,000 times giving rise to 50,000 “randomized” models (null distribution) with an average AUC that was subsequently used to calculate Z score and  $P_z$  SCORE-value.

AUC original model: 0.694

$P_{50,000 \text{ iter}} = 2.0 \cdot 10^{-05}$

Average AUC of null distribution (50.000 models)=0.624

Standard deviation of the AUC=0.0119

Z score=5.78

P-Z score-value= $3.70 \cdot 10^{-09}$

**Supplementary Table 1.** Demographical characteristics of RA patients and healthy controls by region.

Region*	RA cases (n=1360)			Controls (n=1219)			Control type
	Gender M/F (Total)	Mean Age (± SD)	Age (range)	Gender M/F (Total)	Mean Age (± SD)	Age (range)	
Spain	148/405 (553)	61.93±13.71	(21-89)	494/430 (924)	57.33±6.3	(38-73)	Blood donors
Portugal	98/616 (714)	59.99±12.58	(16-93)	29/161 (190)	47.79±13.74	(18-80)	Blood donors
Romania	12/81 (93)	55.94±11	(26-76)	16/89 (105)	54.77±11.75	(25-77)	Blood donors
<b>Total</b>	<b>258/1102 (1360)</b>	<b>60.5±13.04</b>	<b>(16-93)</b>	<b>539/680 (1219)</b>	<b>55.63±9.11</b>	<b>(18-80)</b>	

Spain: Regional Blood Transfusion Centre (Granada-Almeria, Spain).

Portugal: Biobanco-IMM, Lisbon Academic Medical Center, Portugal

Romania: Rheumatology Clinic of the University and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca

**Supplementary Table 2.** Demographic and clinical characteristics of anti-TNF-naïve RA patients.

<b>Anti-TNF naïve patients</b>	
<i>Demographic characteristics</i>	<i>Overall (n=548)</i>
Age (years)	60.08 ± 12.45
Sex ratio (female/male)	4.17 (442/106)
<i>Clinical assessment</i>	
Percentage of patients with RF positivity	384 (70.84)
Percentage of ACPA-positive patients*	328 (68.76)
Current DAS28	4.00 ± 1.29
<i>Treatments</i>	
<i>DMARDs</i>	
Methotrexate (%)	451 (82.30)
Leflunomide (%)	200 (36.50)
Sulphasalazine (%)	103 (18.80)
<i>Biologic agents</i>	
Infliximab (%)	260 (47.45)
Etanercept (%)	242 (44.16)
Adalimumab (%)	192 (35.04)
Golimumab (%)	17 (3.10)
<i>Anti-TNF<math>\alpha</math> Response</i>	
Responder (%)	187 (75.40)
Non-responder (%)	133 (53.63)
Moderate responder (%)	228 (91.94)

Data are means ± standard deviation or n (%). Abbreviations: RF, rheumatoid factor; ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; DAS28, disease activity score; DMARDs, disease-modifying anti-rheumatic drugs. RF and ACPA data were available in 542 and 477 patients, respectively.

**Supplementary Table 3.** Overall association of estrogen-related polymorphisms and risk of RA.

Gene	SNP ID	Effect allele	Overall (n=2579)		RF-positive patients (n=1927)		RF-negative patients (n=1526)	
			OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value
<i>ABCB1</i>	rs1045642	T	<b>1.26 (1.03-1.55)</b>	<b>0.024</b>	1.16 (0.92-1.47)	0.21	<b>1.37 (1.00-1.87)</b>	<b>0.049</b>
<i>ABCB1</i>	rs1922242	A	0.96 (0.76-1.21)	0.73	0.99 (0.75-1.30)	0.95	0.86 (0.62-1.21)	0.39
<i>ABCB1</i>	rs2229109	T	1.13 (0.83-1.53)	0.43	0.99 (0.69-1.42)	0.94	1.14 (0.74-1.76)	0.55
<i>ABCB1</i>	rs1202168	T	1.06 (0.88-1.28)	0.53	1.01 (0.81-1.26)	0.95	1.12 (0.85-1.48)	0.43
<i>ABCB1</i>	rs9282564	T	1.17 (0.41-3.30)	0.77	0.86 (0.28-2.66)	0.80	2.98 (0.35-25.1)	0.32
<i>ABCB1</i>	rs2214102	T	0.89 (0.29-2.73)	0.85	1.03 (0.30-3.53)	0.96	0.58 (0.07-4.75)	0.61
<i>CYP1A1</i>	rs1799814	A	<b>1.33 (0.97-1.81)</b>	<b>0.073</b>	1.20 (0.83-1.74)	0.33	<b>1.57 (1.03-2.40)</b>	<b>0.04</b>
<i>CYP1A2</i>	rs762551	A	1.03 (0.79-1.36)	0.81	0.85 (0.63-1.16)	0.32	1.49 (0.95-2.34)	0.082
<i>CYP1B1</i>	rs1800440	T	1.13 (0.74-1.73)	0.57	1.01 (0.62-1.65)	0.96	1.77 (0.85-3.70)	0.13
<i>CYP1B1</i>	rs1056836	C	0.86 (0.67-1.11)	0.24	0.92 (0.68-1.24)	0.59	0.81 (0.55-1.17)	0.26
<i>CYP1B1</i>	rs10012	G	0.94 (0.78-1.13)	0.49	1.02 (0.82-1.26)	0.89	0.82 (0.62-1.08)	0.15
<i>CYP2C9</i>	rs1799853	T	0.93 (0.76-1.13)	0.45	0.96 (0.76-1.20)	0.71	0.87 (0.65-1.17)	0.35
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	A	<b>1.34 (1.02-1.77)<sup>§</sup></b>	<b>0.038</b>	<b>1.41 (1.02-1.96)<sup>§</sup></b>	<b>0.040</b>	1.20 (0.80-1.80) <sup>§</sup>	0.37
<i>CYP2C19</i>	rs12248560	T	1.14 (0.70-1.84) <sup>§</sup>	0.61	0.90 (0.49-1.66) <sup>§</sup>	0.74	<b>1.83 (1.01-3.32)<sup>§</sup></b>	<b>0.046</b>
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	A	<b>1.26 (1.02-1.56)</b>	<b>0.031</b>	1.16 (0.91-1.49)	0.23	1.28 (0.94-1.75)	0.12
<i>CYP3A4</i>	rs2740574	T	0.66 (0.11-3.95)	0.65	NA (NA-NA)	NA	0.24 (0.38-1.49)	0.13
<i>CYP3A4</i>	rs11773597	C	<b>3.74 (1.61-8.66)<sup>§</sup></b>	<b>0.002</b>	2.43 (0.88-6.75) <sup>§</sup>	0.09	<b>5.93 (2.31-15.2)<sup>§</sup></b>	<b>0.0002</b>
<i>CYP17A1</i>	rs743572	G	1.18 (0.93-1.48) <sup>§</sup>	0.17	1.08 (0.82-1.42) <sup>§</sup>	0.56	<b>1.43 (1.03-1.98)<sup>§</sup></b>	<b>0.03</b>
<i>ESR1</i>	rs851984	A	1.06 (0.88-1.27)	0.54	1.09 (0.87-1.35)	0.46	1.05 (0.81-1.38)	0.70
<i>ESR1</i>	rs2881766	T	0.97 (0.66-1.45)	0.90	0.90 (0.57-1.41)	0.63	0.95 (0.52-1.73)	0.87
<i>ESR1</i>	rs2071454	G	1.01 (0.81-1.27)	0.94	1.02 (0.79-1.33)	0.86	0.98 (0.70-1.38)	0.92
<i>ESR1</i>	rs2077647	G	1.12 (0.92-1.36)	0.24	1.09 (0.87-1.37)	0.46	1.12 (0.84-1.49)	0.45
<i>ESR1</i>	rs827421	A	1.01 (0.81-1.25)	0.94	0.97 (0.75-1.25)	0.82	1.15 (0.83-1.60)	0.40
<i>ESR1</i>	rs2234693	C	1.05 (0.86-1.27)	0.64	1.07 (0.85-1.34)	0.57	1.01 (0.76-1.35)	0.92
<i>ESR1</i>	rs9340799	A	1.04 (0.80-1.36)	0.77	1.09 (0.79-1.50)	0.60	1.18 (0.78-1.78)	0.44
<i>ESR1</i>	rs1801132	G	1.02 (0.85-1.23)	0.82	1.05 (0.84-1.30)	0.69	1.14 (0.87-1.50)	0.33
<i>ESR1</i>	rs3798577	T	0.88 (0.71-1.09)	0.24	1.01 (0.78-1.31)	0.94	<b>0.64 (0.48-0.86)</b>	<b>0.003</b>
<i>ESR1</i>	rs910416	T	0.98 (0.80-1.19)	0.82	1.00 (0.79-1.26)	0.99	0.95 (0.71-1.27)	0.71
<i>ESR2</i>	rs1255998	C	1.24 (0.71-2.19)	0.45	1.10 (0.57-2.13)	0.77	1.18 (0.54-2.57)	0.68
<i>ESR2</i>	rs928554	T	0.86 (0.67-1.10)	0.24	0.88 (0.65-1.17)	0.38	0.82 (0.58-1.17)	0.28
<i>ESR2</i>	rs4986938	T	1.01 (0.84-1.22)	0.93	0.94 (0.76-1.18)	0.60	1.13 (0.85-1.49)	0.40
<i>ESR2</i>	rs1271572	A	1.01 (0.83-1.22)	0.94	1.09 (0.87-1.37)	0.43	0.86 (0.65-1.14)	0.30
<i>GSTP1</i>	rs1695	G	1.11 (0.92-1.33)	0.28	<b>1.29 (1.04-1.59)</b>	<b>0.02</b>	0.87 (0.67-1.14)	0.31
<i>GSTP1</i>	rs1138272	T	1.14 (0.85-1.53)	0.38	1.20 (0.85-1.68)	0.30	1.04 (0.67-1.62)	0.85
<i>HSD17B1</i>	rs605059	T	1.04 (0.85-1.28)	0.68	0.88 (0.69-1.11)	0.29	1.34 (0.98-1.84)	0.07
<i>NR1I2</i>	rs2276706	A	1.03 (0.85-1.23)	0.78	0.99 (0.80-1.23)	0.94	1.14 (0.87-1.50)	0.34
<i>NR1I2</i>	rs1464603	C	0.94 (0.77-1.13)	0.50	0.87 (0.70-1.07)	0.19	1.11(0.85-1.46)	0.43
<i>NR1I2</i>	rs6785049	G	0.99 (0.82-1.20)	0.94	0.94 (0.76-1.17)	0.60	1.30 (0.98-1.72)	0.07



<i>NR1I2</i>	rs2276707	T	1.06 (0.87-1.30)	0.57	1.07 (0.85-1.35)	0.57	1.20 (0.90-1.60)	0.21
<i>NR1I2</i>	rs1054191	A	0.93 (0.76-1.13)	0.48	0.91 (0.72-1.14)	0.40	1.11 (0.83-1.47)	0.49
<i>NR1I2</i>	rs3814057	C	1.03 (0.85-1.25)	0.77	1.05 (0.84-1.32)	0.66	1.08 (0.82-1.43)	0.58
<i>PGR</i>	rs1042838	A	0.85 (0.69-1.04)	0.11	0.87 (0.68-1.11)	0.25	0.79 (0.58-1.08)	0.14
<i>PGR</i>	rs1379130	A	0.94 (0.78-1.14)	0.53	0.88 (0.70-1.09)	0.23	1.05 (0.80-1.39)	0.70
<i>PGR</i>	rs10895068	A	1.13 (0.81-1.57)	0.48	1.22 (0.84-1.78)	0.30	1.03 (0.62-1.70)	0.92
<i>PGR</i>	rs518162	A	<b>1.28 (1.01-1.62)</b>	<b>0.04</b>	1.15 (0.87-1.52)	0.33	1.39 (0.98-1.96)	0.06
<i>SHBG</i>	rs6259	A	0.98 (0.79-1.23)	0.89	1.00 (0.77-1.29)	0.99	1.06 (0.76-1.46)	0.74
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	A	1.17 (0.98-1.41)	0.09	<b>1.36 (1.10-1.69)</b>	<b>0.005</b>	0.95 (0.73-1.24)	0.71

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Estimates were adjusted for age, sex and country of origin.  $P < 0.05$  in bold.

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.

<sup>§</sup> Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.

<sup>‡</sup> Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance.

<sup>‡</sup>*CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> (per-allele  $OR_{Overall} = 1.28$ , 95%CI 1.02-1.60;  $P_{trend} = 0.033$ ).

<sup>‡</sup>*CYP1A1*<sub>rs1799814</sub> (per-allele  $OR_{Overall} = 1.39$ , 95%CI 1.04-1.88;  $P_{trend} = 0.028$ ).

<sup>‡</sup>*CYP2C19*<sub>rs4244285</sub> (per-allele  $OR_{Overall} = 1.27$ , 95%CI 1.05-1.53;  $P_{trend} = 0.012$ ).

<sup>‡</sup>*CYP2C19*<sub>rs1057910</sub> (per-allele  $OR_{RF-Positive} = 0.72$ , 95%CI 0.52-0.98;  $P_{trend} = 0.035$ ).

<sup>‡</sup>*GSTP1*<sub>rs1695</sub> (per-allele  $OR_{RF-Positive} = 1.22$ , 95%CI 1.04-1.43;  $P_{trend} = 0.015$ ).

<sup>‡</sup>*SULT1A1*<sub>rs9282861</sub> (per-allele  $OR_{RF-Positive} = 1.29$ , 95%CI 1.09-1.52;  $P_{trend} = 0.0032$ ).

<sup>‡</sup>*CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> (per-allele  $OR_{RF-Negative} = 1.43$ , 95%CI 1.05-1.94;  $P_{trend} = 0.026$ ).

<sup>‡</sup>*CYP1A1*<sub>rs1799814</sub> (per-allele  $OR_{RF-Negative} = 1.54$ , 95%CI 1.03-2.30;  $P_{trend} = 0.041$ ).

<sup>‡</sup>*ESR2*<sub>rs3798577</sub> (per-allele  $OR_{RF-Negative} = 1.24$ , 95%CI 1.04-1.49;  $P_{trend} = 0.019$ ).

**Supplementary Table 4.** Haplotype association analysis and RA risk.

<b>ABCB1</b>						<b>Overall (N=2579)</b>		
<i>ABCB1</i> <sub>rs1045642</sub>	<i>ABCB1</i> <sub>rs1202168</sub>	<i>ABCB1</i> <sub>rs1922242</sub>	<i>ABCB1</i> <sub>rs2214102</sub>	<i>ABCB1</i> <sub>rs2229109</sub>	<i>ABCB1</i> <sub>rs9282564</sub>	<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
C	C	T	C	C	T	0.2906	1.00	---
T	T	A	C	C	T	0.2879	1.04 (0.88-1.23)	0.66
C	C	A	C	C	T	0.1479	1.00 (0.83-1.21)	0.98
T	C	T	C	C	T	0.0765	0.92 (0.72-1.17)	0.48
T	T	A	C	C	C	0.0600	1.06 (0.83-1.37)	0.63
C	T	A	C	C	T	0.0532	0.91 (0.67-1.23)	0.53

<b>CYP2C9</b>		<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
<i>CYP2C9</i> <sub>rs1799853</sub>	<i>CYP2C9</i> <sub>rs1057910</sub>			
C	A	0.7651	1.00	---
T	A	0.1648	0.93 (0.79-1.09)	0.38
C	C	0.0667	<b>0.74 (0.58-0.94)</b>	<b>0.013</b>

<b>CYP2C19</b>		<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
<i>CYP2C19</i> <sub>rs12248560</sub>	<i>CYP2C19</i> <sub>rs4244285</sub>			
C	G	0.6873	1.00	---
T	G	0.1884	1.00 (0.85-1.17)	0.98
C	A	0.1221	1.13 (0.95-1.36)	0.17

<b>CYP3A4</b>		<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
<i>CYP3A4</i> <sub>rs1173597</sub>	<i>CYP3A4</i> <sub>rs2740574</sub>			
G	T	0.8849	1.00	---
C	T	0.0754	0.91 (0.73-1.13)	0.39
G	C	0.0360	<b>1.43 (1.09-1.88)</b>	<b>0.009</b>

<b>ESR2</b>						
<i>ESR2</i> <sub>rs1255998</sub>	<i>ESR2</i> <sub>rs1271572</sub>	<i>ESR2</i> <sub>rs4986938</sub>	<i>ESR2</i> <sub>rs928554</sub>	<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
C	C	T	T	0.3640	1.00	---
C	A	C	C	0.3635	0.88 (0.76-1.02)	0.095
G	C	C	T	0.1490	<b>0.83 (0.69-0.99)</b>	<b>0.042</b>
C	C	C	T	0.0563	1.04 (0.80-1.36)	0.75
C	C	C	C	0.0219	<b>0.61 (0.39-0.96)</b>	<b>0.033</b>
C	A	C	T	0.0184	0.84 (0.53-1.35)	0.48
C	A	T	T	0.0174	1.18 (0.76-1.83)	0.46

<b>PGR</b>						
<i>PGR</i> <sub>rs1042838</sub>	<i>PGR</i> <sub>rs1379130</sub>	<i>PGR</i> <sub>rs10895068</sub>	<i>PGR</i> <sub>rs518162</sub>	<b>Freq</b>	<b>OR(95%CI)<sup>†</sup></b>	<b>P</b>
C	G	G	G	0.4048	1.00	---
C	A	G	G	0.3115	0.96 (0.82-1.12)	0.62
A	G	G	G	0.1535	0.93 (0.77-1.11)	0.40
C	G	G	A	0.0829	1.17 (0.95-1.44)	0.14
C	G	A	G	0.0343	1.11 (0.82-1.51)	0.49

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model of inheritance. Most common alleles and haplotypes were considered as reference.

**Supplementary Table 5.** Overall association of estrogen-related polymorphisms and response to anti-TNF drugs.

Gene	SNP ID	Effect allele	R vs. NR (n=320)		R vs. NR+MR (n=548)		R vs. NR (n=320)		R vs. NR+MR (n=548)		R vs. NR (n=320)		R vs. NR+MR (n=548)	
			OR (95% CI) <sup>†</sup>	P value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P value	OR (95% CI) <sup>§</sup>	P value	OR (95% CI) <sup>§</sup>	P value	OR (95% CI) <sup>‡</sup>	P value	OR (95% CI) <sup>‡</sup>	P value
ABCB1	rs1045642	T	1.28 (0.74-2.22)	0.37	1.13 (0.74-1.72)	0.56	0.97 (0.54-1.73)	0.92	1.05 (0.67-1.65)	0.82	1.09 (0.78-1.53)	0.62	1.07 (0.82-1.39)	0.62
ABCB1	rs1922242	A	1.01 (0.56-1.81)	0.98	1.14 (0.72-1.82)	0.58	0.88 (0.53-1.47)	0.64	1.10 (0.74-1.63)	0.63	0.95 (0.69-1.32)	0.77	1.09 (0.84-1.41)	0.53
ABCB1	rs2229109	T	1.55 (0.71-3.37)	0.27	1.36 (0.73-2.56)	0.33	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	1.67 (0.80-3.49)	0.18	1.41 (0.77-2.58)	0.27
ABCB1	rs1202168	T	0.92 (0.56-1.52)	0.75	0.95 (0.64-1.40)	0.78	0.75 (0.39-1.42)	0.37	0.87 (0.53-1.43)	0.59	0.88 (0.63-1.25)	0.49	0.94 (0.72-1.22)	0.63
ABCB1	rs9282564	T	NA (NA-NA)	NA	0.82 (0.07-9.09)	0.87	0.70 (0.34-1.44)	0.33	0.94 (0.51-1.72)	0.83	0.77 (0.38-1.54)	0.46	0.93 (0.53-1.63)	0.81
ABCB1	rs2214102	T	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA
CYP1A1	rs1799814	A	0.85 (0.40-1.78)	0.66	0.63 (0.35-1.11)	0.11	0.60 (0.06-5.67)	0.66	0.17 (0.02-1.56)	0.12	0.84 (0.44-1.61)	0.61	0.61 (0.37-1.02)	0.060
CYP1A2	rs762551	A	1.22 (0.55-2.70)	0.62	0.98 (0.55-1.75)	0.94	1.34 (0.83-2.16)	0.23	1.02 (0.70-1.49)	0.90	1.23 (0.86-1.77)	0.26	1.01 (0.76-1.33)	0.96
CYP1B1	rs1800440	T	3.10 (0.79-12.2)	0.11	1.65 (0.69-3.94)	0.26	0.91 (0.55-1.51)	0.72	0.88 (0.59-1.31)	0.53	1.07 (0.70-1.62)	0.77	0.98 (0.71-1.36)	0.91
CYP1B1	rs1056836	C	1.19 (0.60-2.39)	0.62	0.90 (0.53-1.51)	0.68	<b>0.48 (0.27-0.86)</b>	<b>0.014</b>	<b>0.65 (0.42-0.98)</b>	<b>0.042</b>	0.76 (0.52-1.11)	0.16	0.79 (0.59-1.06)	0.11
CYP1B1	rs10012	G	0.92 (0.56-1.52)	0.75	0.73 (0.50-1.09)	0.12	0.99 (0.44-2.20)	0.98	0.94 (0.50-1.75)	0.84	0.95 (0.66-1.38)	0.80	0.84 (0.63-1.11)	0.22
CYP2C9	rs1799853	T	1.30 (0.77-2.18)	0.32	1.49 (0.99-2.24)	0.058	3.95 (0.95-16.4)	0.059	2.83 (0.78-10.2)	0.11	1.40 (0.90-2.18)	0.13	<b>1.49 (1.04-2.14)</b>	<b>0.030</b>
CYP2C9	rs1057910	A	NA (NA-NA)	NA	1.87 (0.11-30.8)	0.66	0.68 (0.33-1.38)	0.28	1.08 (0.59-1.97)	0.81	0.74 (0.37-1.46)	0.38	1.09 (0.62-1.94)	0.76
CYP2C19	rs12248560	T	<b>0.58 (0.34-0.85)</b>	<b>0.044</b>	0.91 (0.61-1.34)	0.63	0.97 (0.29-3.30)	0.96	1.25 (0.50-3.13)	0.63	0.68 (0.43-1.06)	0.090	0.96 (0.70-1.33)	0.82
CYP2C19	rs4244285	A	0.99 (0.56-1.75)	0.98	0.97 (0.63-1.49)	0.88	0.55 (0.13-2.44)	0.43	0.71 (0.24-2.15)	0.55	0.93 (0.58-1.50)	0.78	0.94 (0.65-1.36)	0.74
CYP3A4	rs2740574	T	NA (NA-NA)	NA	1.57 (0.09-26.5)	0.75	1.15 (0.53-2.48)	0.73	1.02 (0.56-1.84)	0.95	1.21 (0.58-2.53)	0.62	1.04 (0.59-1.81)	0.90
CYP3A4	rs11773597	C	0.68 (0.35-1.31)	0.25	0.95 (0.58-1.55)	0.84	0.27 (0.03-2.36)	0.24	0.95 (0.32-2.84)	0.93	0.67 (0.38-1.19)	0.17	0.96 (0.65-1.43)	0.85
CYP17A1	rs743572	G	1.13 (0.67-1.91)	0.66	0.92 (0.61-1.37)	0.67	1.60 (0.93-2.78)	0.092	1.24 (0.79-1.95)	0.35	1.24 (0.89-1.72)	0.20	1.04 (0.80-1.34)	0.79
ESR1	rs851984	A	0.89 (0.55-1.44)	0.65	0.84 (0.58-1.22)	0.37	0.80 (0.41-1.57)	0.52	0.63 (0.37-1.07)	0.087	0.89 (0.64-1.25)	0.51	0.81 (0.62-1.06)	0.13
ESR1	rs2881766	T	1.08 (0.34-3.45)	0.90	1.03 (0.43-2.48)	0.94	0.84 (0.50-1.42)	0.52	0.87 (0.58-1.30)	0.50	0.90 (0.59-1.38)	0.63	0.91 (0.66-1.27)	0.60
ESR1	rs2071454	G	0.90 (0.48-1.68)	0.74	1.00 (0.63-1.59)	1.00	1.80 (0.24-13.1)	0.56	1.61 (0.31-8.50)	0.57	0.96 (0.59-1.69)	0.89	1.03 (0.68-1.57)	0.87
ESR1	rs2077647	G	0.85 (0.50-1.45)	0.55	0.87 (0.57-1.31)	0.51	1.09 (0.59-1.99)	0.79	1.20 (0.75-1.92)	0.46	0.96 (0.67-1.36)	0.81	1.00 (0.76-1.31)	1.00
ESR1	rs827421	A	1.02 (0.57-1.84)	0.95	0.93 (0.59-1.47)	0.76	1.17 (0.68-2.01)	0.58	1.12 (0.73-1.71)	0.61	1.08 (0.76-1.53)	0.69	1.02 (0.78-1.33)	0.89
ESR1	rs2234693	C	0.95 (0.55-1.65)	0.86	0.94 (0.62-1.44)	0.79	0.98 (0.52-1.86)	0.95	1.09 (0.67-1.79)	0.72	0.97 (0.67-1.40)	0.88	1.00 (0.76-1.32)	0.98
ESR1	rs9340799	A	1.13 (0.55-2.29)	0.74	1.06 (0.60-1.87)	0.84	1.01 (0.62-1.65)	0.97	0.98 (0.67-1.44)	0.92	1.04 (0.73-1.48)	0.85	1.00 (0.76-1.33)	0.98
ESR1	rs1801132	G	0.88 (0.54-1.45)	0.62	1.01 (0.69-1.48)	0.96	1.67 (0.58-4.77)	0.34	1.28 (0.51-3.18)	0.60	0.99 (0.67-1.48)	0.98	1.04 (0.75-1.43)	0.81
ESR1	rs3798577	T	1.06 (0.59-1.91)	0.84	0.91 (0.58-1.42)	0.67	1.48 (0.90-2.45)	0.12	1.29 (0.86-1.93)	0.22	1.21 (0.87-1.68)	0.26	1.07 (0.83-1.39)	0.59
ESR1	rs910416	T	0.94 (0.54-1.63)	0.83	0.84 (0.55-1.30)	0.43	0.87 (0.50-1.53)	0.63	0.70 (0.45-1.09)	0.11	0.93 (0.66-1.31)	0.67	0.82 (0.62-1.07)	0.15
ESR2	rs1255998	C	NA (NA-NA)	NA	<b>3.71 (1.14-12.1)</b>	<b>0.030</b>	<b>2.54 (1.40-4.62)</b>	<b>0.002</b>	<b>1.81 (1.18-2.79)</b>	<b>0.007</b>	<b>2.62 (1.51-4.53)</b>	<b>0.001</b>	<b>1.78 (1.23-2.59)</b>	<b>0.002</b>
ESR2	rs928554	T	1.29 (0.68-2.44)	0.43	<b>1.62 (0.98-2.66)</b>	<b>0.058</b>	<b>0.60 (0.36-0.99)</b>	<b>0.045</b>	0.71 (0.48-1.05)	0.083	0.85 (0.61-1.19)	0.35	0.97 (0.74-1.27)	0.83
ESR2	rs4986938	T	<b>2.12 (1.25-3.58)</b>	<b>0.005</b>	<b>1.73 (1.16-2.56)</b>	<b>0.007</b>	1.43 (0.75-2.73)	0.28	1.25 (0.75-2.09)	0.39	<b>1.55 (1.09-2.20)</b>	<b>0.014</b>	<b>1.38 (1.05-1.81)</b>	<b>0.023</b>
ESR2	rs1271572	A	<b>1.75 (1.04-2.93)</b>	<b>0.033</b>	<b>1.58 (1.06-2.36)</b>	<b>0.023</b>	0.80 (0.42-1.53)	0.51	0.70 (0.42-1.17)	0.18	1.21 (0.86-1.70)	0.28	1.13 (0.85-1.50)	0.39

Tesis doctoral de Luz María Canet Antequera

<i>GSTP1</i>	rs1695	G	<b>0.51 (0.31-0.84)</b>	<b>0.008</b>	<b>0.57 (0.38-0.84)</b>	<b>0.004</b>	0.42 (0.18-1.01)	0.052	0.71 (0.40-1.26)	0.24	<b>0.56 (0.38-0.82)</b>	<b>0.003</b>	<b>0.68 (0.51-0.90)</b>	<b>0.007</b>
<i>GSTP1</i>	rs1138272	T	0.53 (0.25-1.13)	0.10	<b>0.49 (0.28-0.87)</b>	<b>0.015</b>	NA (NA-NA)	NA	1.23 (0.12-13.0)	0.87	0.53 (0.25-1.11)	0.094	<b>0.56 (0.33-0.94)</b>	<b>0.028</b>
<i>HSD17B1</i>	rs605059	T	1.20 (0.71-2.03)	0.49	1.22 (0.81-1.84)	0.35	0.83 (0.46-1.51)	0.54	0.99 (0.63-1.57)	0.97	1.02 (0.73-1.43)	0.91	1.08 (0.83-1.41)	0.57
<i>NR1I2</i>	rs2276706	A	1.00 (0.62-1.63)	0.99	1.08 (0.74-1.58)	0.69	0.62 (0.30-1.27)	0.19	0.89 (0.53-1.50)	0.67	0.89 (0.63-1.26)	0.52	1.01 (0.77-1.32)	0.95
<i>NR1I2</i>	rs1464603	C	<b>1.95 (1.19-3.18)</b>	<b>0.008</b>	<b>1.82 (1.25-2.66)</b>	<b>0.002</b>	0.55 (0.25-1.19)	0.13	0.58 (0.32-1.04)	0.067	1.24 (0.88-1.77)	0.22	1.25 (0.93-1.66)	0.13
<i>NR1I2</i>	rs6785049	G	1.56 (0.93-2.62)	0.089	1.33 (0.91-1.97)	0.14	1.21 (0.64-2.28)	0.55	1.12 (0.67-1.88)	0.67	1.30 (0.92-1.84)	0.14	1.19 (0.91-1.57)	0.21
<i>NR1I2</i>	rs2276707	T	1.68 (1.00-2.84)	0.052	<b>1.55 (1.02-2.35)</b>	<b>0.038</b>	1.34 (0.31-5.87)	0.70	1.07 (0.31-3.72)	0.92	1.53 (0.97-2.43)	0.069	1.43 (0.98-2.08)	0.060
<i>NR1I2</i>	rs1054191	A	1.06 (0.63-1.78)	0.84	1.16 (0.80-1.74)	0.49	0.89 (0.13-6.02)	0.91	1.54 (0.40-5.91)	0.53	1.04 (0.64-1.68)	0.87	1.16 (0.81-1.68)	0.42
<i>NR1I2</i>	rs3814057	C	1.62 (0.97-2.71)	0.067	<b>1.52 (1.02-2.28)</b>	<b>0.042</b>	1.35 (0.31-5.92)	0.69	1.04 (0.30-3.59)	0.94	1.50 (0.95-2.37)	0.082	1.41 (0.98-2.04)	0.065
<i>PGR</i>	rs1042838	A	0.72 (0.41-1.27)	0.25	0.79 (0.51-1.21)	0.28	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	0.86 (0.51-1.44)	0.56	0.91 (0.61-1.35)	0.64
<i>PGR</i>	rs1379130	A	1.25 (0.76-2.07)	0.38	1.08 (0.74-1.59)	0.68	0.83 (0.38-1.83)	0.64	0.81 (0.45-1.47)	0.49	1.08 (0.75-1.57)	0.67	1.00 (0.75-1.33)	0.98
<i>PGR</i>	rs10895068	A	1.98 (0.83-4.70)	0.12	1.53 (0.74-3.16)	0.26	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	1.98 (0.83-4.70)	0.12	1.54 (0.76-3.15)	0.23
<i>PGR</i>	rs518162	A	1.47 (0.80-2.70)	0.22	1.30 (0.81-2.10)	0.28	0.74 (0.04-13.0)	0.84	0.20 (0.01-2.84)	0.23	1.39 (0.78-2.47)	0.26	1.21 (0.77-1.91)	0.41
<i>SHBG</i>	rs6259	A	1.47 (0.83-2.61)	0.18	1.28 (0.81-2.03)	0.30	NA (NA-NA)	NA	0.98 (0.17-5.60)	0.98	1.33 (0.77-2.29)	0.30	1.23 (0.80-1.89)	0.34
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	A	1.47 (0.90-2.39)	0.13	1.15 (0.79-1.69)	0.47	1.78 (0.76-4.15)	0.18	1.68 (0.81-3.45)	0.16	1.40 (0.96-2.04)	0.080	1.20 (0.89-1.61)	0.24

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; R, responder; MR, moderate responder; NR, non-responder; OR, odds ratio; CI, confidence interval; RF, rheumatoid factor; ACPA, Anti-citrullinated protein antibodies.

† Estimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

§ Estimates calculated according to a recessive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

ª Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.

P<0.05 in bold.

**Supplementary Table 6.** Haplotype association analysis for anti-TNF drug response.

CYP2C9		R vs. NR (N=320)			R vs. NR+MR (N=548)				
CYP2C9 <sub>rs1057910</sub>	CYP2C9 <sub>rs1799853</sub>	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P		
A	C	0.7768	1.00	---	0.7777	1.00	---		
A	T	0.1604	1.44 (0.92 - 2.24)	0.11	0.1686	<b>1.49 (1.03 - 2.13)</b>	<b>0.032</b>		
C	C	0.0628	1.44 (0.72 - 2.85)	0.30	0.0537	1.02 (0.57 - 1.80)	0.96		
ESR2		R vs. NR (N=320)			R vs. NR+MR (N=548)				
ESR2 <sub>rs1255998</sub>	ESR2 <sub>rs1271572</sub>	ESR2 <sub>rs4986938</sub>	ESR2 <sub>rs928554</sub>	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P
C	C	T	T	0.3668	1.00	---	0.3714	1.00	---
C	A	C	C	0.3613	0.88 (0.60 - 1.28)	0.5	0.3603	0.90 (0.66 - 1.23)	0.52
G	C	C	T	0.1453	<b>0.39 (0.22 - 0.68)</b>	<b>0.0011</b>	0.1383	<b>0.51 (0.34 - 0.77)</b>	<b>0.0014</b>
C	C	C	T	0.0465	0.50 (0.19 - 1.37)	0.18	0.0571	0.93 (0.48 - 1.82)	0.84
C	A	C	T	0.0327	0.43 (0.14 - 1.32)	0.14	0.0243	<b>0.32 (0.12 - 0.85)</b>	<b>0.022</b>
C	A	T	T	0.0150	2.46 (0.50 - 12.2)	0.27	0.0203	2.24 (0.58 - 8.68)	0.24
C	C	C	C	0.0213	0.82 (0.21 - 3.17)	0.77	0.0177	0.59 (0.22 - 1.59)	0.3
GSTP1		R vs. NR (N=320)			R vs. NR+MR (N=548)				
GSTP1 <sub>rs1138272</sub>	GSTP1 <sub>rs1695</sub>	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P	Freq	OR(95%CI) <sup>†</sup>	P		
C	A	0.6352	1.00	---	0.6391	1.00	---		
C	G	0.2939	<b>0.64 (0.42 - 0.98)</b>	<b>0.040</b>	0.2969	0.78 (0.58 - 1.06)	0.12		
T	G	0.0612	<b>0.36 (0.15 - 0.86)</b>	<b>0.022</b>	0.0546	<b>0.40 (0.22 - 0.73)</b>	<b>0.003</b>		

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; R, responder; MR, moderate responder; NR, non-responder; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>†</sup> Estimates calculated according to a dominant model and adjusted for age, sex and country of origin.

Minimum haplotype frequency was set at 0.01. P<0.05 in bold.



**Supplementary Table 7.** Heterogeneity test for each specific estrogen-related marker.

Gene	SNP ID	Effect allele	SPAIN		PORTUGAL		ROMANIA		META-ANALYSIS			
			OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	OR (95% CI) <sup>†</sup>	P-value	I <sup>2</sup> (%)	P <sub>het</sub>
<i>ABCB1</i>	rs1045642	T	1.14 (0.88-1.47)	0.32	<b>1.67 (1.14-2.44)</b>	<b>0.009</b>	1.06 (0.54-2.11)	0.86	1.28 (0.98-1.68)	0.072	31.9	0.230
<i>ABCB1</i>	rs1922242	A	0.95 (0.71-1.28)	0.74	0.93 (0.59-1.47)	0.76	0.79 (0.39-1.63)	0.53	0.93 (0.73-1.17)	0.52	0.0	0.896
<i>ABCB1</i>	rs2229109	T	0.98 (0.68-1.41)	0.92	0.99 (0.50-1.96)	0.97	<b>3.09 (1.04-9.26)</b>	<b>0.043</b>	1.20 (0.71-2.03)	0.50	48.5	0.143
<i>ABCB1</i>	rs1202168	T	0.99 (0.78-1.26)	0.95	1.20 (0.83-1.73)	0.33	0.95 (0.52-1.73)	0.88	1.04 (0.86-1.26)	0.70	0.0	0.660
<i>ABCB1</i>	rs9282564	T	0.98 (0.27-3.54)	0.97	1.27 (0.23-7.00)	0.78	NA (NA-NA)	NA	1.08 (0.39-3.01)	0.89	0.0	0.812
<i>ABCB1</i>	rs2214102	T	0.74 (0.19-2.90)	0.67	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	0.74 (0.19-2.90)	0.67	-	-
<i>CYP1A1</i>	rs1799814	A	1.25 (0.86-1.84)	0.25	1.29 (0.71-2.33)	0.40	3.21 (0.63-16.4)	0.16	1.31 (0.95-1.79)	0.096	0.0	0.543
<i>CYP1A2</i>	rs762551	A	0.92 (0.66-1.29)	0.64	1.27 (0.74-2.19)	0.39	1.46 (0.60-3.52)	0.41	1.04 (0.79-1.37)	0.77	0.0	0.449
<i>CYP1B1</i>	rs1800440	T	1.14 (0.67-1.94)	0.63	1.48 (0.65-3.36)	0.34	0.59 (0.16-2.16)	0.42	1.14 (0.75-1.74)	0.54	0.0	0.504
<i>CYP1B1</i>	rs1056836	C	0.85 (0.61-1.17)	0.32	0.87 (0.56-1.41)	0.61	0.66 (0.28-1.58)	0.35	0.84 (0.65-1.08)	0.17	0.0	0.850
<i>CYP1B1</i>	rs10012	G	0.91 (0.72-1.16)	0.45	1.00 (0.70-1.42)	1.00	0.80 (0.44-1.45)	0.96	0.92 (0.77-1.11)	0.40	0.0	0.806
<i>CYP2C9</i>	rs1799853	T	0.93 (0.73-1.19)	0.56	0.90 (0.61-1.29)	0.54	1.05 (0.53-2.05)	0.89	0.93 (0.77-1.13)	0.48	0.0	0.926
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	A	0.88 (0.22-3.55)	0.86	1.28 (0.21-7.76)	0.79	NA (NA-NA)	NA	1.01 (0.37-3.04)	0.98	0.0	0.747
<i>CYP2C19</i>	rs12248560	T	0.96 (0.75-1.22)	0.73	1.01 (0.70-1.44)	0.97	1.00 (0.56-1.81)	0.98	0.98 (0.81-1.18)	0.82	0.0	0.971
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	A	1.25 (0.96-1.64)	0.10	1.36 (0.89-2.08)	0.15	1.01 (0.52-1.97)	0.97	<b>1.25 (1.01-1.55)</b>	<b>0.042</b>	0.0	0.761
<i>CYP3A4</i>	rs2740574	T	1.64 (0.14-18.5)	0.69	NA (NA-NA)	NA	NA (NA-NA)	NA	1.64 (0.14-18.5)	0.69	-	-
<i>CYP3A4</i>	rs11773597	C	1.30 (0.95-1.76)	0.10	1.13 (0.65-1.96)	0.66	0.88 (0.43-1.84)	0.74	1.20 (0.94-1.55)	0.15	0.0	0.606
<i>CYP17A1</i>	rs743572	G	1.12 (0.88-1.42)	0.36	1.08 (0.75-1.56)	0.67	1.40 (0.65-3.01)	0.39	1.13 (0.93-1.37)	0.24	0.0	0.834
<i>ESR1</i>	rs851984	A	1.00 (0.79-1.26)	0.99	1.25 (0.88-1.79)	0.21	1.06 (0.60-1.90)	0.84	1.07 (0.89-1.29)	0.48	0.0	0.588
<i>ESR1</i>	rs2881766	T	1.13 (0.69-1.85)	0.62	0.54 (0.20-1.49)	0.24	0.92 (0.32-2.66)	0.88	0.97 (0.65-1.46)	0.88	0.0	0.431
<i>ESR1</i>	rs2071454	G	0.93 (0.70-1.23)	0.61	0.98 (0.63-1.53)	0.94	1.37 (0.65-2.89)	0.41	0.98 (0.78-1.23)	0.84	0.0	0.636
<i>ESR1</i>	rs2077647	G	1.12 (0.87-1.44)	0.37	1.30 (0.90-1.87)	0.17	0.72 (0.39-1.31)	0.28	1.10 (0.87-1.41)	0.43	25.4	0.262

Tesis doctoral de Luz María Canet Antequera

<i>ESR1</i>	rs827421	A	1.12 (0.87-1.46)	0.41	0.74 (0.46-1.19)	0.21	1.16 (0.58-2.33)	0.68	1.02 (0.79-1.31)	0.91	15.8	0.305
<i>ESR1</i>	rs2234693	C	1.05 (0.81-1.35)	0.71	1.37 (0.96-1.96)	0.084	0.50 (0.28-0.91)	0.02	0.96 (0.61-1.49)	0.84	75.7	<b>0.016</b>
<i>ESR1</i>	rs9340799	A	1.32 (0.94-1.84)	0.11	0.60 (0.32-1.11)	0.10	0.90 (0.34-2.39)	0.84	0.94 (0.55-1.63)	0.83	59.5	0.085
<i>ESR1</i>	rs1801132	G	1.13 (0.89-1.43)	0.31	0.88 (0.61-1.26)	0.48	0.76 (0.42-1.39)	0.38	1.00 (0.81-1.24)	0.99	12.3	0.320
<i>ESR1</i>	rs3798577	T	0.93 (0.71-1.22)	0.61	0.70 (0.44-1.14)	0.15	0.87 (0.46-1.65)	0.67	0.87 (0.70-1.08)	0.21	0.0	0.596
<i>ESR1</i>	rs910416	T	0.96 (0.75-1.23)	0.74	0.99 (0.66-1.47)	0.94	1.12 (0.55-2.30)	0.74	0.98 (0.80-1.20)	0.84	0.0	0.922
<i>ESR2</i>	rs1255998	C	1.01 (0.48-2.11)	0.98	1.86 (0.68-5.13)	0.23	1.69 (0.41-7.01)	0.47	1.31 (0.75-2.27)	0.34	0.0	0.589
<i>ESR2</i>	rs928554	T	0.79 (0.59-1.07)	0.13	0.75 (0.43-1.29)	0.30	2.00 (0.82-4.89)	0.13	0.91 (0.59-1.40)	0.68	49.4	0.139
<i>ESR2</i>	rs4986938	T	0.96 (0.76-1.22)	0.75	0.92 (0.64-1.33)	0.66	1.54 (0.86-2.75)	0.15	1.01 (0.81-1.26)	0.94	17.8	0.296
<i>ESR2</i>	rs1271572	A	1.08 (0.85-1.38)	0.53	0.90 (0.62-1.29)	0.56	1.09 (0.58-2.02)	0.80	1.03 (0.85-1.25)	0.78	0.0	0.705
<i>GSTP1</i>	rs1695	G	1.22 (0.97-1.54)	0.09	0.82 (0.58-1.17)	0.28	1.53 (0.86-2.71)	0.15	1.11 (0.81-1.53)	0.51	57.4	0.096
<i>GSTP1</i>	rs1138272	T	<b>1.52 (1.05-2.20)</b>	<b>0.025</b>	0.71 (0.39-1.26)	0.24	0.86 (0.41-1.81)	0.69	1.03 (0.61-1.74)	0.92	62.7	0.068
<i>HSD17B1</i>	rs605059	T	1.06 (0.82-1.38)	0.66	0.99 (0.65-1.49)	0.95	1.16 (0.60-2.24)	0.66	1.05 (0.85-1.30)	0.64	0.0	0.918
<i>NR1I2</i>	rs2276706	A	1.15 (0.91-1.45)	0.25	0.86 (0.60-1.24)	0.43	0.93 (0.52-1.65)	0.80	1.04 (0.87-1.26)	0.66	0.0	0.384
<i>NR1I2</i>	rs1464603	C	0.85 (0.68-1.07)	0.18	1.04 (0.73-1.47)	0.85	1.15 (0.64-2.07)	0.63	0.92 (0.77-1.11)	0.39	0.0	0.474
<i>NR1I2</i>	rs6785049	G	0.90 (0.71-1.13)	0.37	1.13 (0.78-1.62)	0.51	1.32 (0.71-2.43)	0.38	0.99 (0.82-1.19)	0.91	0.0	0.370
<i>NR1I2</i>	rs2276707	T	1.01 (0.78-1.31)	0.91	1.02 (0.70-1.49)	0.92	1.76 (0.94-3.30)	0.077	1.10 (0.85-1.41)	0.47	24.9	0.264
<i>NR1I2</i>	rs1054191	A	0.87 (0.68-1.12)	0.29	0.87 (0.59-1.27)	0.47	1.66 (0.90-3.05)	0.10	0.98 (0.72-1.34)	0.91	48.1	0.146
<i>NR1I2</i>	rs3814057	C	0.98 (0.76-1.24)	0.79	1.08 (0.75-1.57)	0.67	1.37 (0.76-2.47)	0.30	1.04 (0.86-1.27)	0.67	0.0	0.575
<i>PGR</i>	rs1042838	A	0.91 (0.70-1.19)	0.50	0.83 (0.56-1.22)	0.35	0.56 (0.28-1.11)	0.097	0.85 (0.69-1.04)	0.12	0.0	0.432
<i>PGR</i>	rs1379130	A	0.99 (0.78-1.25)	0.90	0.82 (0.58-1.16)	0.26	0.92 (0.47-1.81)	0.82	0.93 (0.77-1.12)	0.46	0.0	0.678
<i>PGR</i>	rs10895068	A	1.29 (0.85-1.95)	0.23	0.71 (0.38-1.32)	0.28	1.50 (0.55-4.13)	0.43	1.09 (0.71-1.66)	0.69	29.2	0.244
<i>PGR</i>	rs518162	A	<b>1.36 (1.01-1.82)</b>	<b>0.038</b>	1.13 (0.72-1.77)	0.60	0.94 (0.35-2.57)	0.91	1.26 (1.00-1.61)	0.055	0.0	0.665
<i>SHBG</i>	rs6259	A	1.04 (0.78-1.38)	0.77	0.86 (0.57-1.27)	0.44	0.91 (0.40-2.09)	0.83	0.97 (0.78-1.21)	0.79	0.0	0.741
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	A	<b>1.28 (1.02-1.62)</b>	<b>0.034</b>	1.00 (0.70-1.43)	1.00	0.93 (0.52-1.66)	0.81	1.16 (0.97-1.40)	0.11	0.0	0.384

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Estimates were adjusted for age, sex and country of origin. P<0.05 in bold.

† Estimates calculated according to a dominant model of inheritance and assuming a random-effect model.

# *RESULTADOS DE LOS ARTÍCULOS*

---



## 1. Artículo Primero

---

### 1.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:

---

#### 1.1.1. *Población de estudio.*

Este estudio se llevó a cabo en dos fases. Los individuos que fueron reclutados eran caucásicos europeos y dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio. En la primera fase del estudio participaron un total de 970 individuos reclutados en centros españoles, 458 pacientes diagnosticados de AR según los criterios establecidos por la ACR [87] y 512 controles sanos. Los pacientes fueron tratados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada o el Hospital Reina Sofía de Córdoba entre los años 2004 y 2010. Se recogieron datos demográficos de los casos y los controles así como los datos clínicos necesarios para describir el estado clínico de los pacientes y el grado de actividad de la enfermedad (véase tabla 2 en la separata de trabajo). Utilizamos el parámetro DAS28 para evaluar la actividad clínica de la enfermedad y definimos a los pacientes de AR como pacientes con alta o moderada actividad de enfermedad si el DAS28 era mayor o igual a 3,2 o de baja actividad cuando el valor de DAS28 era inferior a dicha cifra. Los controles se seleccionaron entre los donantes del Centro de Transfusiones Sanguíneas (CRTS) de Granada-Almería.

En una segunda fase del estudio, se reclutaron 831 pacientes con AR y 550 controles sanos que se reclutaron tanto en los centros españoles arriba mencionados como en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y el Hospital CHLN (Lisboa, Portugal).

#### 1.1.2. *Metodología empleada:*

##### *Selección de las variantes genéticas.*

Veintisiete *tagging* SNPs en los genes *DC-SIGN*, *Dectina-1*, *Dectina-2*, *MCP1* y *CCR2* fueron seleccionados para su genotipado en las poblaciones de la fase 1 y 2. La selección de los SNPs se realizó mediante una aproximación de *tagging* y funcionalidad. El *tagging* nos permitió poder evaluar la variabilidad completa de estos genes, mientras que la selección funcional nos permitió analizar la asociación de aquellos SNPs que tenían una funcionalidad ya conocida. El *tagging* se realizó incluyendo sólo aquellos SNPs con una frecuencia superior al 0,05 y con un  $r^2$  (equilibrio de ligamiento) de 0,8. Forzamos la inclusión de los SNPs *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub>, *MCP1*<sub>rs1024610</sub> y *MCP1*<sub>rs1024611</sub> que tenían una funcionalidad conocida.

##### *Genotipado.*

El genotipado de los SNPs se realizó mediante sondas KASPar® (LGC Genomics, UK) mediante una *touch-down* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de acuerdo los protocolos establecidos por el fabricante y en placas de 384 donde los casos y los controles se distribuyeron de forma aleatoria. El 5% de las muestras se incluyeron por duplicado como control de calidad y la concordancia entre duplicados fue siempre superior al 99%.

##### *Análisis de asociación a AR*

Inicialmente evaluamos si los SNPs seleccionados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en la población de controles mediante un análisis estándar de  $\chi^2$  (valores observados-esperados). El análisis de asociación de cada marcador con el riesgo a desarrollar AR se realizó por regresión logística ajustada por edad y género y asumiendo los modelos de herencia co-dominante, dominante y recesivo. Con el objetivo de ver si existían diferencias en la asociación

de los polimorfismos analizados con respecto al género (efecto modificador), realizamos además un análisis de regresión logística estratificado por género que fue ajustado por edad. La significación estadística se estableció en 0,002 de acuerdo al método de corrección de múltiples comparaciones de Meff [326] que considera el número de marcadores independientes analizados.

### *Predicción in silico de la funcionalidad de los SNPs de interés.*

Para la predicción de la funcionalidad biológica de los SNPs asociados con AR utilizamos herramientas *in silico* como el FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) que incluye información de diferentes fuentes (Hapmap, dbSNP, NCBI Blast, Polyphen, SNPs3D, TRANSFACT, ESEfinder, Rescue-ESE and FAS-ESS). Este análisis nos permitió establecer si un SNP en particular podía influir en la unión de determinados factores de transcripción o en procesos como el *splicing*, la unión de microRNAs, la terminación de la traducción o cambios en la secuencia aminoacídica,

## 1.2. Resultados

En este estudio los controles eran ligeramente más jóvenes que los pacientes de AR ( $53,46 \pm 9,69$  vs.  $58,51 \pm 13,13$ ,  $P < 0,001$ ). El 78% de los pacientes de AR eran mujeres y alrededor del 70% de los pacientes presentaban FR y ACPA. Además, observamos que, de acuerdo al DAS28, los hombres presentaban una menor actividad de enfermedad (DAS28=2,89) mientras que las mujeres presentaban una actividad moderada (DAS28=3,42).

Los SNPs analizados se encontraban en HWE con la única excepción del SNP *Dectina-1*<sub>rs16910631</sub> ( $P < 0,01$ ) que fue excluido de los análisis de asociación. En la primera fase del estudio, los análisis de regresión logística mostraron que aquellos individuos que portaban el alelo *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> presentaban un mayor riesgo de AR (OR=1,47; IC 95%: 1,10–1,96;  $P=0,009$ ) mientras que los individuos portadores de los alelos *DCSIGN*<sub>rs4804803G</sub>, *MCP1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP1*<sub>rs13900T</sub> y *MCP1*<sub>rs4586C</sub> tenían un riesgo menor de desarrollar la enfermedad (OR=0,66, IC 95% 0,49–0,88,  $P=0,004$ ; OR=0,66, IC 95% 0,50–0,89,  $P=0,006$ ; OR=0,73, IC 95% 0,55–0,97,  $P=0,03$  y OR=0,68, IC 95% 0,51–0,91,  $P=0,009$ ). Además, observamos que los portadores del alelo *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> mostraban una tendencia a presentar un mayor riesgo a AR (OR=1,35, IC 95% 1,00–1,83,  $P=0,05$ ). Por otra parte, encontramos que los polimorfismos *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> y *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> mostraban asociaciones dependientes o específicas del género ( $P_{\text{interacción}}=0,041$  y  $0,011$ , respectivamente). Las mujeres que portaban los alelos *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> o *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> tenían un mayor riesgo de AR (OR=1,93, IC 95% 1,34–2,79,  $P=0,0003$  y OR=1,90, IC 95% 1,29–2,80,  $P=0,0003$ ) mientras que las que portaban los alelos *MCP1*<sub>rs1024611G</sub>, *MCP1*<sub>rs13900T</sub> y *MCP1*<sub>rs4586C</sub> presentaban un menor riesgo a desarrollar la enfermedad (OR=0,61, IC 95% 0,43–0,87,  $P=0,006$ ; OR=0,67, IC 95% 0,47–0,95,  $P=0,030$  y OR=0,60, IC 95% 0,42–0,86,  $P=0,005$ , respectivamente). Finalmente, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo ( $P_{\text{interacción}}=0,071$ ), encontramos que los hombres portadores del alelo *DCSIGN*<sub>rs2287886A</sub> mostraban un mayor riesgo de AR (OR=1,70, IC 95% 1,03–2,78,  $P=0,04$ ). Los hombres portadores del alelo *DCSIGN*<sub>rs4804803G</sub> además tenían un menor riesgo a desarrollar la enfermedad que las mujeres (OR=0,53, IC 95% 0,32–0,89,  $P=0,02$  vs OR=0,73, IC 95% 0,51–1,04,  $P=0,080$ ).

Tras la corrección por múltiples comparaciones, sólo los SNPs *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> y *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> mostraban efectos significativos ( $P=3,00 \cdot 10^{-4}$  y  $P=9,00 \cdot 10^{-4}$ ) mientras que la asociación de los SNPs *DCSIGN*<sub>rs4804803G</sub>, *MCP1*<sub>rs1024611G</sub> y *MCP1*<sub>rs4586C</sub> mostraban una asociación marginal ( $P=0,004$ ,  $P=0,006$  y  $P=0,009$ ).



En la segunda fase del estudio, que incluía una cohorte con similares características clínicas, pudimos confirmar que los individuos portadores de los SNPs *MCP1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP1*<sub>rs13900</sub>, *MCP1*<sub>rs4586</sub> y *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub> tenían un riesgo menor de padecer AR (OR=0,76, IC 95% 0,61–0,95, P=0,01; OR=0,77, IC 95% 0,62–0,96, P=0,02; OR=0,80, IC 95% 0,64–0,99, P=0,04; y OR=0,77, IC 95% 0,62–0,96, P=0,02). Aunque no existía un efecto modificador del género estadísticamente significativo, los SNPs en *Dectina-2* y *MCP1* parecían tener un efecto mayor en mujeres que en hombres, mientras que las variantes en *DC-SIGN* tenían un efecto más evidente en hombres. Las mujeres portadoras del alelo *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> tenían un mayor riesgo de AR (OR=1,38, IC 95% 1,08–1,77, P=0,01) mientras que las portadoras de los alelos *MCP1*<sub>rs1024611G</sub> y *MCP1*<sub>rs13900T</sub> tenían un riesgo menor a desarrollar la enfermedad (OR=0,74, IC 95% 0,58–0,94, P=0,02 y OR=0,76, IC 95% 0,59–0,97, P=0,03). Asimismo, aquellas mujeres portadoras del alelo *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> mostraron una tendencia a un mayor riesgo de AR (OR=1,30, IC 95% 1,00–1,69, P=0,05) mientras que aquellas mujeres que portaban el alelo *MCP1*<sub>rs4586C</sub> tenían un riesgo menor de padecer AR (OR=0,78, IC 95% 0,61–1,00, P=0,05). Ninguno de estos efectos podía observarse en hombres. Sin embargo, pudimos observar que los hombres que portaban el alelo *DC-SIGN*<sub>rs4804803G</sub> presentaban un menor riesgo de AR (OR=0,56, IC 95% 0,34–0,93, P=0,02) y que los que portaban el alelo *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> tenía una tendencia a un mayor riesgo de AR (OR=1,54, IC 95% 0,96–2,46, P=0,07). A pesar del interés de estas asociaciones vinculadas al género, ninguna de ellas permanecía significativa tras la corrección por el test de comparaciones múltiples.

Un análisis *in silico* nos permitió deducir que los SNPs *Dectina-2*<sub>rs7134303</sub> y *MCP1*<sub>rs1024611</sub> estaban ubicados en lugares de unión a factores de transcripción y que, por tanto, podrían influir en la regulación la expresión génica de sus respectivos genes (*risk score* 1–2 y 1–3, respectivamente). Mientras que el alelo *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> crea un lugar de unión para el factor de transcripción GATA-1 y podría ser un potenciador de la expresión, el alelo *MCP1*<sub>rs1024611T</sub> podría impedir la unión de los factores GATA-1 y GATA-2 al promotor de *MCP1*.

Finalmente, investigamos las posibles interacciones entre los SNPs para modular el riesgo a desarrollar la enfermedad. Nuestro análisis mostró que existía un modelo de interacción de dos locus en mujeres (*Dectina-2*<sub>rs4264222</sub> y *Dectina-2*<sub>rs7134303</sub>) que actuaban sinérgicamente para incrementar el riesgo a desarrollar la enfermedad (P=0,007). En hombres no encontramos ningún modelo de interacción estadísticamente significativo.

## 2. Artículo segundo

---

### 2.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:

---

#### 2.1.1. Población de estudio.

Todos los participantes en este estudio eran caucásicos y firmaron un consentimiento informado. Dicho estudio se llevó a cabo en dos fases. En la primera fase del estudio participaron un total de 371 pacientes de AR y 689 controles sanos. Los pacientes fueron diagnosticados de AR según los criterios establecidos por la ACR [87] y clasificados según los criterios de la ACR/AULAR [110]. Los pacientes estuvieron tratados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada o el Hospital Reina Sofía de Córdoba entre los años 2004 y 2010. Los controles se seleccionaron entre los donantes del Centro de Transfusiones Sanguíneas (CRTS) de Granada-Almería.

En una segunda fase del estudio, se reclutaron 926 pacientes con AR y 548 controles sanos. El Hospital de Santa María de Lisboa, Portugal, reclutó a 773 pacientes de AR y 201 controles. Noventaicinco pacientes de AR y 105 controles provenían de la Clínica Reumatológica Universitaria de 'Iuliu Hatieganu' Cluj-Napoca (Rumanía). Además, el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela reclutó a 58 pacientes adicionales, mientras que el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada reclutó a 242 controles sanos. La descripción de los datos clínicos que fueron recogidos y las características de la población de estudio quedó recogida en el artículo primero (tabla 2) y en la tabla 2 de la separata del trabajo. Tras la exclusión de 34 participantes no caucásicos y de 32 muestras por razones técnicas, la población de estudio comprendió un total de 1239 pacientes de AR y 1229 controles.

### *2.1.2. Metodología empleada:*

#### *Selección de las variantes genéticas.*

Los SNPs fueron seleccionados por su potencial funcionalidad, su implicación en la respuesta inmune y/o por su asociación con enfermedades autoinmunes.

#### *Genotipado*

El genotipado de los SNPs se realizó mediante sondas KASPar® (LGC Genomics, UK) a través de una PCR *touch-down* según establece el fabricante en placas de 384 donde los casos y los controles se distribuyeron aleatoriamente. El 5% de las muestras se incluyeron por duplicado como control de calidad interno.

#### *Análisis de asociación a AR*

Realizamos un análisis de HWE en el grupo de controles mediante un análisis estándar de  $\chi^2$  (valores observados-esperados). La posible asociación de los marcadores seleccionados con el riesgo a desarrollar AR fue analizada por regresión logística ajustando por edad, género y centro de origen. La significación estadística se estableció en 0,00032 mediante el programa *SNP Spectral Decomposition Lite* (<http://qump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPspDsuperlite/>) de acuerdo al método de corrección de múltiples comparaciones de Meff [326] (que considera el número de marcadores independientes analizados) y teniendo en cuenta el número de modelos de herencia testados.

#### *Análisis de haplotipos*

Los bloques de LD y los análisis de asociación de haplotipos se realizaron mediante SNPTools [327] y SNPstats [328]. Los bloques de LD los representamos gráficamente usando los valores de  $r^2$  y de acuerdo con el método descrito por Gabriel y colaboradores (2002) [329].

#### *Análisis de interacción SNP-SNP*

Las interacciones entre SNPs las analizamos mediante el algoritmo MDR (*multifactor dimensionality reduction*) [330]. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de P era menor o igual a 0,05 y se validaron mediante un test de permutaciones realizado en R (<http://www.epistasis.org>).

#### *Análisis de correlación genotipo-fenotipo: expresión génica*

Para valorar la plausibilidad biológica de nuestros hallazgos, analizamos la correlación entre los SNPs de interés y la expresión génica del gen correspondiente en muestras de sangre periférica de 44 donantes sanos. Todas las muestras se analizaron por triplicado mediante una PCR cuantitativa

a tiempo real y protocolos establecidos por el fabricante (Stratagene). La cuantificación relativa de los niveles de expresión del ARNm fue calculada mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y se comparó entre los diferentes genotipos de interés mediante el test de Mann-Whitney. Además, la base de datos GENEVAR (GENe Expression VARIation, <https://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>) nos permitió correlacionar los datos de expresión del ARNm de IL4 con los genotipos.

### *Meta-análisis*

Cuando fue posible realizamos un meta-análisis de nuestros datos con los previamente publicados disponibles en la base de datos DRAP (*database of RA-related polymorphisms*). Los criterios de selección de estudios previos fueron: a) estudios de casos y controles en caucásicos, b) estudios que reportasen datos de frecuencia genotípica, OR y P-valor, c) datos de asociación a riesgo de AR o a la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Consideramos significativos aquellos valores de asociación con una P-valor inferior a 0,05. Utilizamos el estadístico I<sup>2</sup> para evaluar la heterogeneidad de los estudios incluidos en el meta-análisis y computamos la OR global asumiendo un modelo de efectos aleatorios. Este tipo de modelo es más conservador que el modelo de efectos fijos y da lugar a intervalos de confianza más amplios asegurando así unos resultados más fiables sobretodo cuando los datos provienen de estudios con un diseño diferente.

### *Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$*

Los pacientes de AR tratados con fármacos anti-TNF $\alpha$  (infliximab, adalimumab, o etanercept) fueron clasificados según los criterios del EULAR [110] como “respondedores”, “respondedores moderados” y “no respondedores”. Sólo se consideraron para éste análisis los pacientes que hubieran tenido un seguimiento de al menos 6 meses y que tuvieran recogidos los datos de DAS28 al comienzo del tratamiento y al final del periodo de evaluación. El análisis de asociación se llevó a cabo mediante regresión logística ajustada por edad, género y centro de origen y comparando en primera instancia los pacientes “respondedores” y “no-respondedores” y, posteriormente, los pacientes “respondedores” con los “respondedores moderados” y “no respondedores”.

## 2.2. Resultados:

Los pacientes de AR incluidos en este estudio eran significativamente mayores que los controles (58,01 $\pm$ 12,98 vs. 52,69 $\pm$ 9,11, P<0,001) y, como cabía esperar, eran mayoritariamente mujeres (ratio de hombres y mujeres 230/1009=0,22 vs. 544/689=0,79, respectivamente). Las características clínicas de las poblaciones utilizadas en la fase 1 y 2 fueron muy similares (ver tabla 2 de la separata adjunta). Ambas poblaciones tenían similares niveles de actividad de enfermedad (DAS28=3,25 vs. DAS28=3,65) y casi idéntico porcentaje de pacientes positivos para FR y ACPA (FR=73,41 y ACPA=72,97 vs. FR=75,30 y ACPA=75,92).

Los SNPs analizados en este estudio cumplían el HWE a excepción de *IL4R*<sub>rs1805011</sub>, *IL10*<sub>rs3024509</sub> y *IL12A*<sub>rs582054</sub>. Estos SNPs fueron excluidos de los análisis. Los análisis de asociación mostraron que los individuos portadores del alelo *IL4*<sub>rs2070874T</sub> tenían un mayor riesgo de desarrollar AR cuando se comparaban con los portadores del genotipo más común (OR= 1,41, IC 95% 1,04-1,89, P=0,03). Además, observamos que la presencia de cada copia adicional de los alelos *IL8RB*<sub>rs1126580G</sub> y *VEGFA*<sub>rs25648T</sub> incrementaba el riesgo de AR (OR= 1,17, IC 95% 0,97-1,42, P=0,09 y OR= 1,27, IC 95% 0,97-1,67, P=0,08, respectivamente). De igual manera, la adición de cada copia del alelo *IL4R*<sub>rs1801275G</sub> tendía a disminuir el riesgo a desarrollar la enfermedad (OR= 0,80, IC 95% 0,63-1,02, P=0,08).

En un intento por confirmar estos resultados preliminares ampliamos el estudio con una segunda fase de reclutamiento en la que incorporamos 868 pacientes de AR y 540 controles sanos. Tras genotipar los SNPs más prometedores y todos aquellos incluidos los genes de interés, pudimos confirmar que los portadores de los alelos  $IL4_{rs2070874T}$  y  $IL8RB_{rs1126580G}$  y el genotipo  $IL8RB_{rs2230054C/C}$  tenían un mayor riesgo de AR (OR= 1,37, IC 95% 1,11-1,71, P=0,004; OR= 1,36, IC 95% 1,10-1,69, P=0,005 y OR= 1,31, IC 95% 1,05-1,63, P=0,02, respectivamente). Además, el desarrollo de esta segunda fase nos permitió confirmar que el efecto de estos polimorfismos sobre el riesgo a desarrollar AR parecía seguir un patrón aditivo (OR= 1,37, IC 95% 1,13-1,67, P=0,0016; OR= 1,23, IC 95% 1,08-1,41, P=0,002 y OR= 1,19, IC 95% 1,04-1,36, P=0,01, respectivamente).

La reconstrucción de los haplotipos en base a nuestros datos genotípicos además reveló que el polimorfismo  $IL4_{rs2243248}$  representaba a una señal independiente, mientras que las variantes  $IL4_{rs2070874}$  y  $IL4_{rs2243250}$  se encontraban en *linkage disequilibrium* ( $r^2=0,86$ ). El análisis de asociación de los haplotipos mostró que el haplotipo  $IL4_{CCT}$  asociaba con un mayor riesgo de desarrollar AR (OR= 1,35, IC 95% 1,11-1,64, P=0,003). Asimismo, el análisis mostró que las variantes  $IL8RB_{rs2230054}$  y  $IL8RB_{rs1126580}$  estaban en *linkage disequilibrium* ( $r^2=0,77$ ), y que los individuos que portaban el haplotipo  $IL8RB_{CG}$  tenían un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad (OR= 0,80, IC 95% 0,70-0,92, P=0,001).

Tras la corrección por el test de comparaciones múltiples (P=0,0003), ninguno de los efectos arriba descritos alcanzaba la significación estadística. Sin embargo, la asociación de las variantes  $IL4_{rs2070874}$  y  $IL8RB_{rs1126580}$  con un mayor riesgo a desarrollar AR se mantenía cerca del límite de significación (asociación marginal) cuando se asumían modelos de herencia co-dominante, dominante y aditivo. A pesar de estos datos, el análisis de haplotipos nos permitió confirmar que los pacientes que portaban los haplotipos  $IL4_{CCT}$  y  $IL8RB_{CG}$  tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR (P=0,003 y 0,001) lo que, sin duda, apoyaba la hipótesis que sugiere un papel de estos genes en la modulación del riesgo a desarrollar la enfermedad.

Teniendo en cuenta nuestros resultados con los SNPs en  $IL4$  y los datos descritos en estudios previos que sugerían una asociación del polimorfismo  $IL4_{rs2243250}$  con el riesgo de AR, decidimos realizar un meta-análisis para confirmar la implicación de este locus en la modulación del riesgo a desarrollar la enfermedad. Tras una cuidadosa revisión de la literatura seleccionamos 5 estudios previos que, junto con el nuestro, permitió realizar un análisis con un total de 7150 individuos, 3883 casos de AR y 3267 controles. Los resultados confirmaron que el alelo  $IL4_{rs2243250T}$  y todos los SNPs en LD con él (incluyendo el  $IL4_{rs2070874}$ ) asocian significativamente con el riesgo a desarrollar AR (OR= 1,19, IC 95% 1,07-1,31, P=0,0010). El test de heterogeneidad de Cochran nos confirmó la validez del análisis y la alta homogeneidad de los estudios analizados ( $P_{het}=0,89$ ).

En un intento por entender el mecanismo biológico subyacente a la asociación de los SNPs en la región promotora del gen de  $IL4$  con el riesgo de AR, decidimos además investigar si las variantes en este *locus* afectaban a la expresión del gen. Analizamos los niveles de expresión del  $IL4$  mRNA en muestras de sangre periférica de 44 individuos sanos y observamos que no existía una correlación positiva cuando clasificábamos a los individuos de acuerdo a los genotipos de  $IL4$  ( $IL4_{rs2070874}$  P=0,61, test de *Mann–Whitney*). Estos datos coinciden con los descritos en la base de datos de expresión génica en *Genevar* para diferentes líneas celulares (P=0,41 para  $IL4_{rs2070874}$  y  $IL4_{rs2243250}$ ). Estos datos sugerían que más que afectar a la expresión génica los polimorfismos de  $IL4$  podrían afectar a otros procesos biológicos como el procesamiento del mRNA de  $IL4$ , su estabilidad o incluso inducir modificaciones post-transcripcionales.

Aunque la falta de investigaciones previas no nos permitió realizar un meta-análisis para validar la asociación de los SNPs en *IL8RB* (*IL8RB*<sub>rs1126580</sub> y *IL8RB*<sub>rs2230054</sub>) con el riesgo de AR, observamos que existía una interacción significativa y consistente (CVC 10/10) del polimorfismo *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> con el SNP *CCR5*<sub>rs2734648</sub> (P=0,0107) que confirmaba que el locus *IL8RB* puede jugar un papel relevante en la susceptibilidad a AR. El test de permutaciones nos permitió confirmar la solidez del modelo de interacción (P=0,028) que tenía una consistencia (*cross validation consistency*) de 10 sobre 10 y una precisión (*testing balance accuracy*) de 0,5431.

Finalmente, dada la importancia que parecen tener algunos polimorfismos en genes inmunomoduladores en la modulación del riesgo a desarrollar AR, decidimos además evaluar si los SNPs seleccionados podían influir en la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Al igual que en los análisis de asociación con el riesgo de AR, realizamos un análisis de asociación en dos fases y excluyendo los SNPs que no estaban en HWE (*IL4R*<sub>rs1805011</sub>, *IL10*<sub>rs3024509</sub> y *IL12A*<sub>rs582054</sub>). En una primera fase realizamos un análisis de asociación en una cohorte de 149 pacientes de AR tratados con fármacos anti-TNF $\alpha$  (84 respondedores y 65 no-respondedores). Los resultados obtenidos se confirmaron en una segunda población de 132 pacientes de AR (77 respondedores y 55 no-respondedores). Los resultados mostraron que los pacientes portadores del alelo *CCR5*<sub>rs2734648T</sub> tenían un mayor riesgo a presentar una respuesta terapéutica pobre (OR=2,06, IC 95% 1,02-4,13, P=0,040) mientras que los portadores del alelo *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> presentaban un menor riesgo de fracaso terapéutico (OR=0,40, IC 95% 0,20-0,81, P=0,009). El análisis de asociación incluyendo los pacientes de ambas fases confirmó el resultado observado para el polimorfismo *IFNG*<sub>rs2069705</sub> (OR=0,50, IC 95% 0,30-0,83, P=0,0075 y OR<sub>alélica</sub>=0,57, IC 95% 0,38-0,86, P=0,0058). Es importante destacar que la consistencia de esta asociación se confirmó al incluir en el análisis de asociación a los pacientes con una respuesta terapéutica moderada. En línea con estos resultados, el análisis de haplotipos mostró asociaciones significativas de similar magnitud para 2 haplotipos de IFNG (P=0,040 y P=0,028) que sugerían que el polimorfismo *IFNG*<sub>rs2069705</sub> es responsable del efecto observado en la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Dado que ninguna de las asociaciones descritas con la respuesta terapéutica sobrevivía tras la corrección por el test de múltiples comparaciones, consideramos que es necesario desarrollar estudios adicionales que confirmen nuestros resultados.

### 3. Artículo tercero

---

#### 3.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:

---

##### 3.1.1. Población de estudio.

El estudio incluyó a 2637 individuos caucásicos, 1412 pacientes de AR y 1225 controles sanos. Todos los participantes aceptaron por escrito su participación en el estudio. Los pacientes diagnosticados de AR cumplían los criterios publicados por la ACR/EULAR [110] y fueron tratados entre los años 2004 y 2014 en sus centros sanitarios. La descripción de los datos clínicos que fueron recogidos y las características de la población de estudio quedó recogida en el artículo primero (tabla 2) y en la tabla 1 de la separata del trabajo. Los departamentos de reumatología de los hospitales Virgen de las Nieves de Granada y Reina Sofía de Córdoba reclutaron a 486 pacientes de AR, mientras que el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela reclutó otros 58 pacientes de AR. Los novecientos treinta y dos controles sanos incluidos provenían del Centro de Transfusiones Sanguíneas (CRTS) de la región de Granada-Almería. El hospital de Santa María de Lisboa (Portugal) reclutó 773 pacientes de AR y 191 controles. Por último, 95 pacientes y

102 controles provenían de la Clínica Reumatológica Universitaria de ‘Iuliu Hatieganu’ Cluj-Napoca de Rumanía. Tras la exclusión de 20 muestras por razones técnicas, la población de estudio resultó en un total de 2617 individuos, 1392 pacientes de AR y 1225 controles.

### 3.1.2. Metodología empleada:

#### *Selección de las variantes genéticas*

Cinco SNPs del gen *TNFRSF1B* (rs1061622, rs1061624, rs1061631, rs3397, rs5746026) fueron seleccionados mediante una aproximación de *tagging* y funcionalidad y se genotiparon en todos los individuos que participaron en el estudio. El *tagging* nos permitió poder evaluar la variabilidad completa de este gen, mientras que la selección funcional nos permitió analizar la asociación de aquellos SNPs que tenían una funcionalidad ya conocida. El *tagging* se realizó incluyendo sólo aquellos SNPs con una frecuencia superior al 0,05 y con un  $r^2$  (equilibrio de ligamiento) de 0,8.

#### *Genotipado*

El Genotipado de las muestras se realizó con sondas de unión específica de alelo KASPar® (LGC Genomics, UK) de acuerdo a los protocolos establecidos por el fabricante. Los productos de las PCRs se analizaron con el programa SDS vs 2.4 (Applied Biosystems). Las muestras de ADN de los casos y los controles se distribuyeron aleatoriamente en placas de 384 y un 5% se incluyeron por duplicado como control de calidad. La concordancia entre duplicados fue siempre superior al 99%.

#### *Análisis de asociación a AR*

Realizamos un test de HWE en el grupo control mediante un análisis estándar de  $\chi^2$ . Los resultados del genotipado fueron analizados por regresión logística ajustada por edad, sexo y región (país de origen) para evaluar el impacto de cada marcador en el riesgo de AR. Con el objetivo de ver si existía un efecto modificador del FR, realizamos además un análisis de regresión logística estratificado por FR. La significación estadística se estableció en 0,0025 de acuerdo al número de modelos de herencia testados (co-dominante, dominante y recesivo) y al método de corrección de Bonferroni que considera el número de marcadores independientes analizados.

#### *Análisis de haplotipos*

Los bloques de LD y los análisis de asociación de haplotipos los realizamos mediante las herramientas SNPTools [327] y SNPstats [328]. Los bloques los representamos gráficamente usando los valores de  $r^2$  y de acuerdo con el método de Gabriel y colaboradores (2002) [329].

#### *Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$*

Quinientos noventa y seis pacientes de AR tratados con fármacos anti-TNF $\alpha$  fueron clasificados como “buenos respondedores” (n=209), “respondedores moderados” (n=237) y “no-respondedores” (n=150) según los criterios del EULAR [110]. Los criterios de inclusión de pacientes en el estudio fueron: seguimiento de al menos de 6 meses, raza caucásica y datos de DAS28 disponibles. El análisis de asociación de cada marcador con la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  se realizó por regresión logística ajustada por edad, género, región, FR y ACPA. Para el análisis de las asociaciones comparamos en primer lugar a los pacientes “respondedores” con los “no respondedores” y, en segundo lugar, agrupando a “respondedores” y “respondedores moderados”.

#### *Meta-análisis*



Las asociaciones de los SNPs en *TNFRSF1B* con AR y la respuesta a la medicación anti-TNF $\alpha$  fueron validadas a través meta-análisis con los datos de estudios previamente publicados. La selección de esos estudios se realizó mediante una precisa búsqueda en Pubmed y en la base de datos DRAP (*database of RA-related polymorphisms*) basándonos en los siguientes criterios: a) estudios de casos y controles en caucásicos, b) estudios que reportasen datos de frecuencia genotípica, OR y P-valor, c) datos de asociación a riesgo de AR o a la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Consideramos significativos aquellos valores de asociación con un valor de P inferior a 0,05.

### 3.2.Resultados:

Las características clínicas de los pacientes se detallan en la Tabla 1 de la separata del trabajo adjunto. Los pacientes de AR eran significativamente mayores que los controles ( $57,62\pm 13,04$  vs.  $52,99\pm 8,99$ ,  $P<0,001$ ) y tenían una ratio mujer/hombre significativamente más alta que los controles ( $1125/267=4,21$  vs.  $680/645=1,24$ , respectivamente). El porcentaje de pacientes positivos para FR y ACPA fue del 65,90% y 69,13% respectivamente. Los pacientes presentaban una actividad moderada de la enfermedad (DAS28=3,56) y aproximadamente el 42% de ellos había sido tratado con algún agente biológico durante el curso de su enfermedad.

Todos los SNPs analizados se encontraban HWE a excepción del polimorfismo *TNFRSF1B*<sub>rs5746026</sub> ( $P<0,001$ ) que fue excluido de los análisis de asociación. Los resultados de los análisis de regresión logística mostraron que los portadores del alelo *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> presentaban un mayor riesgo de AR comparado con aquellos que portaban el genotipo T/T (OR=1,40, 95% CI 1,16–1,71,  $P=0,0006$ ). Esta asociación sobrevivió la corrección de comparaciones múltiples lo que confirmaba el papel de esta variante en la determinación del riesgo de desarrollar AR. Además, observamos que el efecto de este polimorfismo sobre el riesgo de AR era independiente de la presencia de FR. El análisis estratificado por RF reveló la existencia de un efecto similar en pacientes seropositivos y seronegativos (OR<sub>FR+</sub>=1,35, IC 95% 1,08-1,69 vs. OR<sub>FR-</sub>=1,41, IC 95% 1,08-1,85). Aunque tratamos de replicar la asociación de este SNP con el riesgo de AR a través de la combinación de nuestros datos con aquellos de estudios de GWAS previamente publicados y disponibles en Immunobase ([www.immunobase.org/page/Welcome/display](http://www.immunobase.org/page/Welcome/display)), no pudimos encontrar datos para esta variante en las plataformas de genotipado disponibles.

Además del efecto observado para este polimorfismo en la región 3'-UTR, el análisis de asociación de haplotipos reveló la existencia de un haplotipo relativamente raro que incluía al alelo *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> (*TNFRSF1B*<sub>GGGG</sub>, frecuencia=0,029) y que asociaba significativamente con el riesgo de padecer AR (OR=2,79, IC 95% 1,48–5,24,  $P=0,0015$ ). Estos datos sugerían que el polimorfismo *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> o algún SNP cercano que estuviera en equilibrio de ligamiento con él podía ser la variante causal, es decir, la variante responsable del efecto observado.

Por otra parte, en contra de lo publicado con anterioridad, nuestros datos mostraron que no existía una asociación significativa del polimorfismo *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> con el riesgo a desarrollar AR. En un intento por evaluar en más detalle el efecto de este SNP sobre el riesgo a padecer la enfermedad, decidimos realizar un meta-análisis de nuestros datos con aquellos de 7 estudios previos y que incluyó 4142 pacientes diagnosticados de AR y 3331 controles caucásicos. El meta-análisis asumiendo un modelo de herencia dominante o recesivo confirmó nuestros resultados y nos permitió concluir que el *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> no parece ser un marcador de susceptibilidad para AR (OR<sub>Meta-Dom</sub>=1,02, IC 95% 0,929–1,121,  $P=0,67$  y OR<sub>Meta-Rec</sub>=1,09, IC 95% 0,898–1,333,  $P=0,37$ , respectivamente).

Finalmente, evaluamos el nivel de asociación de los polimorfismos de *TNFRSF1B* y la respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes respondedores y no respondedores a la terapia. El análisis de regresión logística mostró que los pacientes que portaban los genotipos *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> presentaban un riesgo considerablemente mayor de fracaso terapéutico en comparación con los que portaban los alelos de referencia (OR=4,19; IC 95% 1,19–14,7, P=0,019 y OR=3,37, IC 95% 1,02–11,1, P=0,040). Cuando se asumía un modelo de herencia aditivo observamos que cada copia de los alelos *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> incrementaba significativamente el riesgo de fracaso terapéutico tras el tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR=1,56, IC 95% 1,03–2,37, P=0,036 y OR=1,60, IC 95% 1,02–2,51, P=0,041; respectivamente). El análisis combinando de respondedores (n=209) y moderados respondedores (n=237) además confirmó que los individuos que portaban los genotipos *TNFRSF1B*<sub>rs3397C/C</sub>, *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G/G</sub> o *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A/A</sub> presentaban un mayor riesgo de fracaso terapéutico (OR=2,34, IC 95% 1,21–4,50, P=0,014; OR=3,84, IC 95% 1,45–10,22, P=0,0085 y OR=2,94, IC 95% 1,16–7,46, P=0,028, respectivamente). De nuevo, cuando asumíamos un modelo de herencia aditivo, confirmamos que la exclusiva adición de una copia de los alelos *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> bastaba para incrementar el riesgo a sufrir fracaso terapéutico (OR=1,55, IC 95% 1,08–2,22, P=0,018 y OR=1,71, IC 95% 1,17–2,50, P=0,0059).

En consonancia con nuestros datos, algunos estudios previos han descrito que el polimorfismo *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> puede tener un impacto en la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$ . En base a nuestras propias observaciones pero también a los datos ofrecidos por estos estudios, decidimos realizar un meta-análisis que nos permitiera confirmar o descartar esta hipótesis. Los resultados del meta-análisis (n=600, 335 respondedores y 265 no-respondedores) mostraron que la variante *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> no asocia con la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  ni cuando se asume un modelo de herencia dominante ni cuando el modelo usado es recesivo (OR<sub>DOM</sub>=1,30, IC 95% 0,932–1,823, P=0,122 y OR<sub>REC</sub>=1,28, IC 95% 0,62–2,61, P=0,50). Los estudios incluidos en el meta-análisis mostraban un alto nivel de homogeneidad (heterogeneidad no significativa) lo que confirmaba la solidez de las conclusiones alcanzadas.

Finalmente, el análisis de haplotipos reveló que el haplotipo *TNFRSF1B*<sub>GACT</sub> (conteniendo el alelo *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> pero no los alelos *TNFRSF1B*<sub>rs1061622G</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061631A</sub>) asociaba con un riesgo significativamente mayor de no responder al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR=2,18; IC 95% 1,10–4,34, P=0,027). El efecto de este haplotipo no se modificaba cuando combinábamos los pacientes respondedores y respondedores moderados en el análisis, lo que sugería que el efecto observado era consistente y se debía probablemente a la presencia de *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> que, según se ha demostrado, determina la velocidad a la que el mRNA del *TNFRSF1B* se degrada.

#### 4. Artículo cuarto

---

##### 4.1. Justificación del diseño y breve descripción de los resultados:

---

###### 4.1.1. Población de estudio.

La población de estudio incluyó a 2579 individuos, 1360 pacientes de AR y 1219 controles sanos. Todos los participantes eran caucásicos y confirmaron su interés a participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado. Los pacientes fueron tratados entre los años 2004 y 2014, y cumplían los criterios de 1987 de la ACR [87] y los publicados por la ACR/EULAR

[110]. La descripción detallada de la población se incluye en la tabla suplementaria 1 de la separata del trabajo.

#### 7.2.4. Población de replicación

Con el objetivo de replicar las asociaciones consideradas de interés en respuesta a fármacos anti-TNF, utilizamos datos genéticos de un GWAS previamente publicado por el registro DREAM [297]. El GWAS incluía información de 2.557.253 SNPs de 882 pacientes holandeses diagnosticados con AR según los criterios establecidos por la ACR [87]. Los datos clínicos de estos pacientes quedaron recogidos en el registro del estudio DREAM (*Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring*) [297].

#### 4.1.2. Metodología empleada:

##### *Selección de las variantes genéticas.*

En base a la extensa literatura que sugiere un papel de las hormonas esteroideas y sus receptores así como sus transportadores y enzimas metabolizantes en la modulación de la cronificación de la respuesta inmune, seleccionamos cuarenta y siete SNPs potencialmente funcionales en genes relacionados con estos procesos.

##### *Genotipado*

El genotipado de los SNPs se realizó mediante sondas KASPar® (LGC Genomics, UK) a través de una PCR *touch-down* de acuerdo a los protocolos establecidos en placas de 384 donde los casos y los controles fueron distribuidos aleatoriamente. El 5% de las muestras se incluyeron por duplicado como control de calidad interno.

##### *Análisis de asociación a AR*

El test de HWE se analizó en el grupo de controles mediante un análisis estándar de  $\chi^2$  (valores observados-esperados). Los análisis de asociación de los SNPs con el riesgo de AR fue analizada por regresión logística lineal y ajustados por edad, género y región de origen. Los posibles efectos modificadores del FR y del ACPA fueron estudiados mediante análisis estratificados. La significación estadística se estableció en 0,0003 de acuerdo al método de corrección de múltiples comparaciones de Meff [326] y el número de modelos de herencia testados para descartar la existencia de posibles falsos positivos.

##### *Análisis de haplotipos*

Los análisis de haplotipos fueron realizados mediante STATA y ajustados por edad, sexo y región de acuerdo a un modelo de herencia dominante. Las frecuencias de los haplotipos se determinaron mediante el algoritmo EM (*Expectation-maximization*) de manera que el haplotipo más común fue usado como el de referencia y la frecuencia mínima para un haplotipo se estableció en 0,01. La reconstrucción de los haplotipos de cada locus se calcularon mediante las herramientas SNPTools [327] y haploview y los bloques de LD se representaron gráficamente usando los valores de  $r^2$  y de acuerdo con el método de Gabriel y colaboradores (2002) [329].

##### *Análisis de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF $\alpha$*

Quinientos cuarenta y ocho pacientes de AR tratados con infliximab, etanercept, o adalimumab fueron clasificados según los criterios del EULAR en “respondedores” (n=187), “respondedores moderados” (n=228) y “no respondedores” (n=133). Los criterios de inclusión de

los pacientes fueron tener un seguimiento mínimo de 6 meses y datos del DAS28 antes de la terapia y al final del periodo de evaluación. Los análisis se realizaron por regresión logística ajustada por edad, género y región, y comparando, en primer término, a los pacientes “respondedores” y “no-respondedores” (excluyendo al grupo de “respondedores moderados”) y, posteriormente agrupando los pacientes “respondedores moderados” y “no respondedores”. Además, se realizaron análisis estratificados por FR y ACPA para estudiar el posible efecto modificador de estos parámetros.

#### *Meta-análisis con datos de GWAS previos*

Cuando fue posible, la asociación de los SNPs con la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  fue validada mediante un meta-análisis de nuestros datos con los previamente publicados en un estudio de GWAS [297]. La heterogeneidad de los dos estudios se analizó mediante la estadística de  $I^2$ . El meta-análisis se realizó siguiendo un modelo de efectos aleatorios (suponiendo que la variación entre los estudios podría depender de la casualidad o la variación aleatoria y un efecto de estudio individual). Los modelos de efectos aleatorios son más conservadores que los modelos de efectos fijos y dan lugar a intervalos de confianza más amplios (IC), lo que garantiza la fiabilidad de los resultados a pesar de que los datos provengan de estudios con un diseño diferente.

#### *Test de heterogeneidad de la población*

Dada la naturaleza multicéntrica de este estudio que posibilita la existencia de estratificación en la población, decidimos evaluar si los valores de asociación para todos los SNPs testados era diferente en los diferentes países reclutadores. Para ello, realizamos un meta-análisis asumiendo un modelo de herencia dominante y un efecto aleatorio. La heterogeneidad entre los SNPs fue analizada mediante el estadístico de  $I^2$ .

#### *Predicción in silico de la funcionalidad de los SNPs de interés.*

La funcionalidad de los SNPs de interés se investigó mediante el análisis de la información disponible en Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) y ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>).

#### *Análisis eQTL: expresión génica*

Además, analizamos si alguno de los SNPs que asociaba con el riesgo de AR o con la respuesta a fármacos correlacionaban con los niveles de expresión de su respectivo ARNm en PBMCs (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/> y <http://www.gtexportal.org/home/>) o en diferentes tejidos (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/genevar-gene-expression-variation-archive>).

#### *Modelo predictivo y capacidad de discriminación*

Por último, analizamos el valor de los SNPs seleccionados para la predicción de la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  mediante un análisis de regresión logística de Cox. Construimos un modelo de incluyendo la edad, el sexo y el FR junto con los SNPs que mostraron una asociación significativa con la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$  en el análisis de asociación individual ( $P < 0,05$ ). Entonces, en base a los valores de LD ( $r^2$ ) y al valor de P más alto fuimos eliminando variables genéticas hasta que todas las variables tenían un valor de P menor de 0,10 (Figura Suplementaria 1 en la separata del trabajo). La capacidad discriminativa del modelo se analizó mediante el área bajo la curva (AUC) ROC (*receiver operating characteristic*). El modelo predictivo final con las variables genéticas con una  $P < 0,10$  se comparó frente a un modelo de referencia que incluía sólo las covariables demográficas (edad y sexo) y el FR. El test de verosimilitud LR ( $-2 \log \text{likelihood ratio}$ ) nos permitió

determinar la diferente capacidad predictiva de estos modelos. Finalmente, hicimos una prueba de aleatorización de modelos con 50.000 repeticiones para confirmar que el modelo que obteníamos tenía consistentemente una mayor capacidad predictiva que los modelos aleatorizados. Todas las pruebas se realizaron utilizando el software estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.), STATA (v.12, StataCorp, College Station, TX) y el software R (<http://www.r-project.org/>).

#### 4.2. Resultados:

Un total de 1360 pacientes de AR y 1229 controles sanos se incluyeron en este estudio multicéntrico. Los pacientes de AR eran ligeramente mayores que los controles ( $60,50 \pm 13,04$  vs.  $55,62 \pm 9,11$ , respectivamente) y mostraban una mayor proporción de mujeres que de hombres ( $1102/258=4,27$  vs.  $680/539=1,26$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ). Un total de 548 pacientes recibieron terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$  (infliximab, etanercept o adalimumab) como primera terapia biológica. Las características demográficas y clínicas más relevantes están incluidas en la Tabla 2 y la Tabla Suplementaria 2 de la separata del trabajo.

Todos los SNPs evaluados se encontraban en HWE en la población control ( $P < 0,001$ ). El análisis de regresión logística reveló la existencia de asociaciones globales y/o específicas del FR entre SNPs ubicados en los genes *ABCB1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *ESR1*, *GSTP1*, *PGR* y *SULT1A1* y el riesgo de padecer AR (OR=0,64-5,93). El efecto más relevante se observó para los portadores del genotipo *CYP3A4*<sub>rs1773597C/C</sub> que tenían un riesgo casi 4 veces mayor de desarrollar AR comparado con los portadores del alelo más común (OR=3,74, IC 95% 1,61-8,66,  $P=0,002$ ). En línea con este hallazgo que sugiere un papel de *CYP3A4* en la modulación del riesgo de AR, observamos que el haplotipo *CYP3A4*<sub>GG</sub> (que no incluía el alelo *CYP3A4*<sub>rs1773597C</sub>) estaba asociado con un mayor riesgo de la enfermedad (OR=1,43, IC 95% 1,09-1,88,  $P=0,009$ ). Además, en apoyo del carácter funcional de este SNP, un reciente estudio ha descrito su implicación en la regulación de la expresión de *TRIM4* en PBMCs de individuos sanos ( $P=2,01 \cdot 10^{-35}$ , Z-score=12,42, FDR=0,00) y ha demostrado que mapea junto a potenciadores de la acción de las histonas en 5 tejidos diferentes. Aunque habría sido interesante validar la asociación de este SNP de acuerdo a un modelo recesivo mediante un meta-análisis con datos genéticos de bases de datos públicas, no pudimos encontrar información genética analizada según este modelo de herencia.

Tras analizar el posible impacto de las variantes seleccionadas con el riesgo de AR, decidimos además evaluar si podían influir en la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Los análisis de regresión logística revelaron que los pacientes portadores de los alelos *ESR2*<sub>rs4986938T</sub>, *ESR2*<sub>rs1271572T</sub> y *NR1I2*<sub>rs1464603C</sub> o el genotipo *ESR2*<sub>rs1255998C/C</sub> tenían un mayor riesgo a no responder a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$  (OR<sub>rs4986938T</sub>=2,12, IC 95% 1,26-3,58,  $P=0,005$ , OR<sub>rs1271572T</sub>=1,75, IC 95% 1,04-2,94,  $P=0,033$ , OR<sub>rs1464603C</sub>=1,95, IC 95% 1,19-3,18,  $P=0,008$  y OR<sub>rs1255998C</sub>=2,54, IC 95% 1,40-4,62,  $P=0,002$ ), mientras que los portadores del alelo *GSTP1*<sub>rs1695G</sub> o el genotipo *CYP1B1*<sub>rs1056836C/C</sub> mostraban una mejor respuesta terapéutica (OR<sub>rs1695G</sub>=0,51, IC 95% 0,31-0,84,  $P=0,008$  y OR<sub>rs1056836C/C</sub>=0,48, IC 95% 0,27-0,86,  $P=0,014$ ). Además, observamos que, cuando asumíamos un modelo de herencia aditivo, cada copia del alelo *ESR2*<sub>rs1255998C</sub> incrementaba significativamente el riesgo de fracaso terapéutico (OR=2,62, IC 95% 1,52-4,53,  $P=0,001$ ) mientras que cada copia del alelo *GSTP1*<sub>rs1695G</sub> reducía significativamente dicho riesgo (OR=0,56, IC 95% 0,38-0,82,  $P=0,003$ ). Estos datos sugerían un efecto dependiente de la dosis de alelo que se confirmaron cuando los pacientes con una respuesta moderada fueron incluidos en los análisis. Aunque el efecto de estos SNPs sólo alcanzaba una significación marginal tras el ajuste por el test de comparaciones múltiples, observamos que los haplotipos *ESR2*<sub>GCC</sub> (que no incluía los alelos

asociados con fracaso terapéutico) y *GSTP1*<sub>TG</sub> (incluyendo el alelo asociado a buena respuesta) asociaban con un menor riesgo a fracaso terapéutico ( $P=0,001$  y  $P=0,003$ , respectivamente). Estos resultados sugerían que el efecto atribuido a los genes *ESR2* y *GSTP1* sobre la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  podía deberse a los haplotipos (más que a la acción de las variantes aisladas) y que éstos podrían directamente influir en la regulación de la expresión de los ARNm de *ESR2* y *GSTP1* y constituir elementos reguladores de estos genes. En apoyo de esta hipótesis, observamos que los polimorfismos *ESR2*<sub>rs928554</sub>, *ESR2*<sub>rs4986938</sub> y *ESR2*<sub>rs1255998</sub> correlacionan de forma intensa con los niveles de expresión del ARNm de *ESR2* en muestras de sangre periférica y líneas celulares linfoblastoides (con valores de significación que oscilaban entre  $P=2,82 \cdot 10^{-26}$  y  $P=2,55 \cdot 10^{-2}$ ) mientras que el *GSTP1*<sub>rs1695</sub> correlacionaba con la expresión de su ARNm en una amplia gama de tejidos (con valores de P que oscilaban entre una  $9.73 \cdot 10^{-6}$  y  $8.06 \cdot 10^{-9}$ ). En línea con estos datos además encontramos que el *GSTP1*<sub>rs1695</sub> se ubica en regiones de promotoras y potenciadoras (*enhancers*) de histonas en una importante variedad de líneas celulares y tejidos y que cambiaba los motivos de unión de factores de transcripción como POL2, CTCF, MAX y USF1. Todos estos resultados sugieren que tanto *ESR2* como *GSTP1* podrían ser eQTLs para la respuesta anti-TNF $\alpha$  en AR.

Para validar estos resultados decidimos realizar un meta-análisis con los datos de un GWAS de respuesta a fármacos anti-TNF previamente publicado por el grupo holandés de la Dr. Marieke Coenen (DREAM Registry, <http://www.dreamregistry.nl/en>; n=882) que evaluaba la asociación de SNPs con los cambios en el DAS28. Para ello, realizamos análisis de regresión lineal que revelaron que los polimorfismos *GSTP1*<sub>rs1695</sub>, *GSTP1*<sub>rs1138272</sub>, *CYP1A1*<sub>rs1799814</sub>, *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> y *CYP1B1*<sub>rs1056836</sub> correlacionaban positivamente con un descenso del DAS28 (OR<sub>rs1695</sub>=1,22, IC 95% 1,02-1,45,  $P=0,033$ , OR<sub>rs1138272</sub>=1,55, IC 95% 1,06-2,27,  $P=0,023$ , OR<sub>rs1799814</sub>=1,66, IC 95% 1,19-2,34,  $P=0,003$ , OR<sub>rs11773597</sub>=1,43, IC 95% 1,10-1,86,  $P=0,008$  y OR<sub>rs1056836</sub>=1,34, IC 95% 1,02-1,76,  $P=0,032$ ) mientras que las variantes *CYP2C9*<sub>rs1799853</sub>, *PGR*<sub>rs518162</sub> y *SULT1A1*<sub>rs9282861</sub> mostraban un efecto opuesto, es decir, asociaban con el fracaso terapéutico (OR<sub>rs1799853</sub>=0,30, IC 95% 0,15-0,63,  $P=0,001$ , OR<sub>rs518162</sub>=0,74, IC 95% 0,56-0,99,  $P=0,042$  y OR<sub>rs9282861</sub>=0,80, IC 95% 0,67-0,96,  $P=0,017$ ). Aunque los datos de GWAS carecían de datos de asociación para 18 variantes, el meta-análisis confirmó que los pacientes que portaban los alelos *ESR2*<sub>rs1255998C</sub> y *PGR*<sub>rs518162A</sub> tenían un cambio en el DAS28 significativamente menor que los portadores del genotipo de referencia ( $P=0,012$ ;  $I^2=0,0\%$ ;  $P_{\text{Het}}=0,49$  y  $P=0,011$ ;  $I^2=0,0\%$ ;  $P_{\text{Het}}=0,48$ ). Mediante un estudio de heterogeneidad descartamos una posible estratificación de nuestra población así como la heterogeneidad entre los dos estudios que comparamos en el meta-análisis. Estos datos confirman la influencia de *ESR2* y *PGR* en la respuesta a fármacos anti-TNF $\alpha$ . Como se ha mencionado con anterioridad, los polimorfismos en la región 3'-UTR del gen *ESR2* correlaciona con los niveles de expresión del mRNA mientras que el polimorfismo *PGR*<sub>rs518162</sub> puede modular la actividad de las histonas y alterar el sitio de unión a factores de transcripción (POL2, FOXA1, GATA3, TAF1, TBP y EGR1) implicados en el control de la respuesta inmune, en la interacciones de *ESR2* con la cromatina y, más importante, con los efectos dependientes de *ESR2* sobre la respuesta fármacos.

Finalmente, teniendo en cuenta estos resultados, nos planteamos si el genotipado de los polimorfismos asociados con la respuesta a anti-TNF $\alpha$  nos podría facilitar la predicción de la respuesta de los pacientes con AR. Para ello, realizamos un análisis de regresión de Cox y curvas ROC. Nuestros datos mostraron que la incorporación de sólo 5 SNPs asociados con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  (*CYP1B1*<sub>rs1056836</sub>, *ESR2*<sub>rs4986938</sub>, *ESR2*<sub>rs1271572</sub>, *GSTP1*<sub>rs1695</sub> y *NR1I2*<sub>rs2276707</sub>) a un modelo con variables demográficas y clínicas mejoraba sustancialmente la capacidad de predecir la respuesta terapéutica (AUC=0,694, 95%IC 0,673-0,751 vs. AUC=0,607, 95%IC 0,545-0,669;  $P_{\text{LR}}$



$t_{\text{test}}=8,89 \cdot 10^{-07}$ ). La consistencia de este importante resultado fue evaluada mediante un test de 50.000 permutaciones (donde los genotipos para cada SNP fueron randomizados) que confirmó que ninguno de los 50.000 modelos randomizados tenía una capacidad predictiva mejor que nuestro modelo genético ( $Z \text{ score}=5.78$  y  $P_{Z \text{ score } (50.000)}=3,70 \cdot 10^{-09}$ ).

# *DISCUSIÓN*

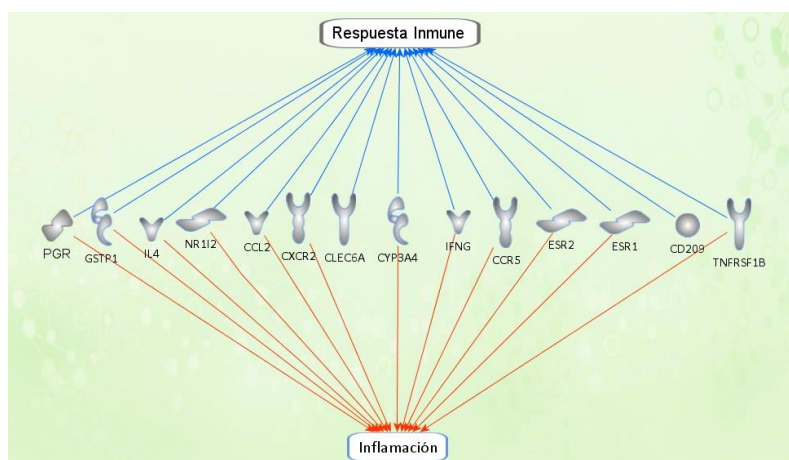
---



La AR es una de las enfermedades reumáticas más incapacitantes ya que los pacientes sufren numerosas inflamaciones articulares, dolor y pérdidas de movilidad que deterioran notablemente su calidad y esperanza de vida [80, 81]. La AR afecta al 1% de la población mundial y a unas 200.000 personas en nuestro país [1]. Según el estudio EPISER, cada año se diagnostican 20.000 casos nuevos en España, implicando un coste anual de entre 10.000 y 14.000€ por paciente en función del tratamiento administrado y de la evolución de la enfermedad [128]. A pesar de que la introducción de los agentes biológicos ha mejorado notablemente el tratamiento de la AR en las últimas décadas, su elevado coste y el alto porcentaje de fracaso terapéutico que todavía existe hacen que el impacto socioeconómico de esta enfermedad autoinmune sea muy elevado. Para la implementación de estrategias primarias de prevención de AR y para la optimización del tratamiento de los pacientes se hace necesario desarrollar herramientas aplicables a la clínica que faciliten a una intervención efectiva por parte del equipo clínico.

A pesar de la falta de conocimiento que aún existe sobre la etiopatogenia de la AR, hoy sabemos que la enfermedad se produce como resultado de la interacción de factores hormonales, ambientales y genéticos [70, 196]. MacGregor y colaboradores demostraron que la heredabilidad atribuida a la AR alcanza el 60% [255] y estudios genéticos, además, han permitido identificar más de un centenar de regiones del genoma asociadas con susceptibilidad de la AR y su progresión. Algunas de estas variantes están en genes relacionados con la respuesta inmune (*HLA*, *PTPN22*, *CTLA4*, *PADI4*, *TNFAIP3* o *STAT4*) [257-262]. Recientes estudios de genes candidato, GWAS y sus meta-análisis han demostrado que la presencia de polimorfismos en genes inmunomoduladores y genes relacionados con el transporte, señalización y metabolismo de las hormonas esteroideas puede influir tanto en el desencadenamiento de la enfermedad como en su evolución y en la respuesta a los tratamientos empleados para combatir la enfermedad (Figura 14) [69, 271, 291, 300-307]. Sin embargo, aun son pocos los marcadores genéticos de riesgo identificados para la AR.

**Figura 14.** Ejemplos de algunas moléculas implicadas en la respuesta inmune y/o la inflamación y codificadas por genes inmunomoduladores o relacionados con las hormonas esteroideas.



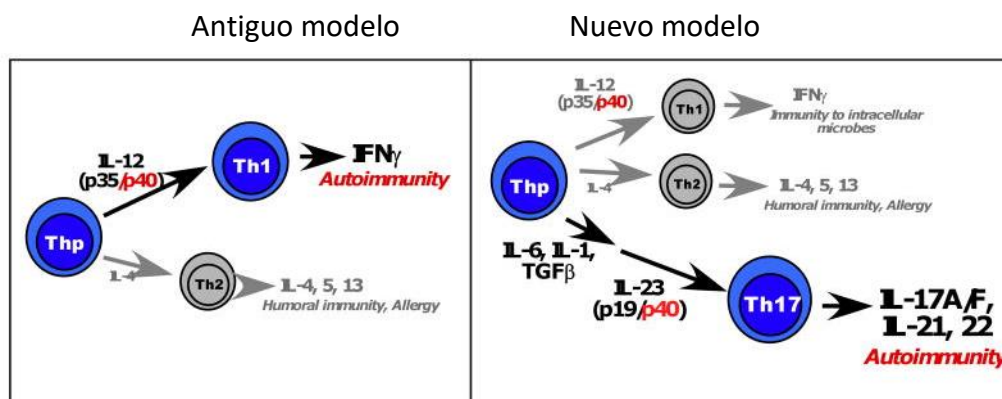
© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Gracias a programas como el IPA que analiza las interacciones biológicas que se han descrito en la literatura científica podemos investigar la implicación biológica de moléculas inmunomoduladoras y relacionadas con el transporte, señalización y metabolismo de las hormonas esteroideas en los procesos inmunes y/o la inflamatorios.

Basándonos en la importancia de la genética en la AR y en las hipótesis previamente descritas, nuestro grupo de investigación ha diseñado y realizado estudios de genes candidato para evaluar si existen marcadores genéticos de AR capaces de modular la respuesta inmune y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . A continuación discutimos los resultados obtenidos en cada uno de los estudios que componen la presente tesis.

## 1. Impacto de los marcadores genéticos relacionados con la vía Th17 en la predisposición a la AR

El hecho de que en los últimos años las células Th17 hayan sido diana para el tratamiento de la AR pone de manifiesto la importancia de esta vía en la etiopatogenia de la enfermedad. Aunque los resultados de los estudios clínicos con fármacos con anticuerpos anti-IL17 están limitados por la heterogeneidad y corta duración de los mismos [198], sabemos que su uso reduce significativamente la destrucción tisular durante el trascurso de la enfermedad y que dicho efecto parece deberse a la inhibición de la actividad de ciertos tipos celulares como las células dendríticas, los macrófagos y las células T. La activación de esta vía está mediada, al menos en parte, por la función de ciertas moléculas de adhesión (lectinas) y coestimuladoras así como de la acción de determinadas quimioquinas (MCP1) a través de sus receptores (CCR2). Entre ellas cabe destacar a algunas lectinas del tipo C como la Dectina-1, la Dectina-2 y DC-SIGN así como el eje MCP1/CCR2 que se encuentran sobrepresadas en el sinovio de los pacientes con AR y regulan la activación de las células T en el lugar de la inflamación.



Sarah L. Gaffen, Curr Rheumatol Rep. 2009 Oct [331].

Teniendo presente la relevancia que parece tener la vía Th17 en el desarrollo de la AR pero además el componente genético de la enfermedad [71, 332], nuestro grupo se planteó evaluar si la presencia de polimorfismos genéticos de un único nucleótido podía influir en la modulación de esta vía y, por tanto, en el riesgo a desarrollar AR. Además, ya que algunos estudios han sugerido que la presencia de ciertos marcadores genéticos en genes del sistema inmune (*TNF*, *TNFR2*, *IL4R* y *CD4*) podría contribuir a las diferencias en incidencia observadas en AR entre géneros [333-336], decidimos evaluar si el efecto de los polimorfismos analizados podía ser específico del género.

Los resultados de nuestro estudio confirmaron que 4 SNPs en los genes *Dectina-2* (rs7134303 y rs4264222), *MCP1* (rs13900) y *DC-SIGN* (rs4804803) asociaban con el riesgo de desarrollar AR y confirmó la ausencia de asociación de la variante *Dectina-1*<sub>rs16910526</sub> con el riesgo de AR, en línea con lo descrito por Plantinga y colaboradores en 2010 [287]. Sin embargo, a diferencia de los resultados publicados previamente por Dieguez-González y colaboradores (2009)[337], nuestros

datos sugerían que la variante *DC-SIGN*<sub>rs4804803</sub> influye sobre el riesgo de AR. Las discrepancias entre estos estudios pueden deberse al distinto tamaño de las cohortes estudiadas o a la presencia de ciertas variables confusoras, como el sexo.

En este estudio describimos por primera vez cómo la presencia de variantes genéticas en los genes *Dectina-2*, *MCP1* y *DC-SIGN* contribuye a establecer las diferencias de género observadas en la incidencia de AR. Las mujeres que presentaban el alelo *Dectina-2*<sub>rs4264222T</sub> tenían un riesgo significativamente incrementado de desarrollar AR mientras que las que portaban los alelos *MCP1*<sub>rs1024611G</sub> y *MCP1*<sub>rs13900T</sub> tenían un menor riesgo a padecer la enfermedad comparado con aquellos que presentaban el genotipo más común. Además, observamos que, aunque no alcanzaba la significación estadística, las mujeres que portaban el alelo *Dectina-2*<sub>rs7134303G</sub> tendían a tener un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad mientras que las mujeres que tenían el alelo *MCP1*<sub>rs4586C</sub> mostraban una asociación marginal con un menor riesgo a desarrollar AR. En hombres, no se observaban ninguno de los efectos mencionados pero se observó que los hombres que portaban el alelo *DC-SIGN*<sub>rs2287886A</sub> mostraban una tendencia a tener un mayor riesgo de AR. Aunque no existía una interacción estadísticamente significativa del género con ninguno de los SNPs analizados, los polimorfismos en *Dectina-2*, *MCP1* y *DC-SIGN* mostraban asociaciones en mujeres que no se observaban en hombres y viceversa. Cuando corregimos por el test de comparaciones múltiples observamos que los efectos que presentaban los polimorfismos *Dectina-2*<sub>rs4264222</sub>, *MCP1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP1*<sub>rs13900</sub> y *MCP1*<sub>rs4586</sub> resultaban marginales tanto para el riesgo a desarrollar la enfermedad como para las asociaciones específicas de género.

Los análisis de interacción SNP-SNP específicos de género sugerían que el efecto combinado de las variantes modulaba el riesgo de AR tanto si los SNPs presentaban una asociación significativa con el riesgo a desarrollar la enfermedad como si había una ausencia de efecto independiente. La aproximación MDR nos permitió descubrir un modelo de interacción sinérgica entre *Dectina-2*<sub>rs7134303</sub> y *Dectina-2*<sub>rs4264222</sub> que incrementaba el riesgo de AR y que estaba presente sólo en mujeres. Aunque estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que los modelos estadísticos de interacción entre SNPs no se pueden asumir como una interacción biológica real. Sin embargo, los análisis *in silico* permiten formular hipótesis acerca de la distinta implicación de los genes en los mecanismos biológicos. Así, observamos que estos dos SNPs (*Dectina-2*<sub>rs7134303</sub> y *Dectina-2*<sub>rs4264222</sub>) resultaban relevantes tanto en los análisis individuales como en los análisis epistáticos. La variante *Dectina-2*<sub>rs7134303</sub> provoca un cambio de alelo en un sitio de unión específico para el factor de transcripción GATA-1, el cual se expresa en los monocitos circulantes y participa en la maduración y supervivencia de las DCs [338]. Este dato sugiere que dicho SNP podría actuar como un potenciador intrónico capaz de modular la transcripción de *Dectina-2*, afectando así a la señalización intracelular y disminuyendo la expresión del mencionado gen. Basandonos en nuestros hallazgos, resulta razonable sugerir que los SNPs en *Dectina-2* pueden influir, al menos en parte, en las diferencias asociadas al género de la susceptibilidad de AR, ya sea mediante un efecto independiente o a través de interacciones.

*Dectina-2* es un receptor transmembrana tipo II que participa en la exacerbación de la respuesta inmune mediada por las células Th17 y la vía del NFκB en la AR. Este receptor reconoce antígenos propios o extraños y se expresa en las DCs, macrófagos y células B [339](Figura 15). Por otro lado, *Dectina-2* estimula la respuesta inflamatoria mediante su unión a ligandos endógenos en las células T de los subtipos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [340, 341]. Asimismo, *Dectina-2* también induce la activación de NFκB dependiente de Syk y CARD9 [342], provocando la liberación de mediadores proinflamatorios como citoquinas, quimioquinas y moléculas coestimuladoras que aumentan la respuesta inmune mediada por las células T. De hecho, el Dr. Sato y sus colaboradores

demonstraron que Dectina-1 se une directamente a Syk, mientras que Dectina-2 se asocia a FcγR para acoplarse a Syk y activar la vía NFκB y liberar citoquinas como TNFα e IL1RA [343]. Igualmente, Dectina-2 modula la vía Th17 y la producción de IL1β e IL23 mediante una activación de NFκB dependiente de c-Rel [344]. La suma de estos hallazgos junto al papel que juegan las vías Th17 y NFκB en la patogénesis y/o progresión de la AR, sugiere que Dectina-2 ejerce una acción clave en la exacerbación de la respuesta inmune en la enfermedad. Aunque aun debe ser clarificado el mecanismo molecular por el cual las variantes en *Dectina-2* afectan al riesgo de AR, nuestra predicción *in silico* y el papel de GATA-1 en DCs y monocitos, sugieren que el SNP *Dectina-2*<sub>rs7134303</sub> podría alterar la expresión del gen y promover la activación de NFκB y la secreción de citoquinas clave en la AR (TNF e IL1RA) mediadas por *Dectina-2*. No obstante, el papel de los SNPs en *Dectina-2* requiere ser estudiado más profundamente ya que no podemos descartar que se encuentren en *linkage disequilibrium* con otras variantes genéticas causales de los mencionados efectos biológicos.

Por otro lado, MCP1 es una quimioquina que cuando se une a su receptor (CCR2) provoca una quimio-atracción de monocitos y macrófagos al lugar de la inflamación y activa a las células T (Tabla 9)[345, 346]. Se ha demostrado que los niveles de esta quimioquina están aumentados en el líquido sinovial de los pacientes con AR y que MCP1 es capaz de incrementar la infiltración de leucocitos en el lugar de la inflamación (Tabla 9)[347]. Igualmente, se ha descrito que la expresión del ARNm de *MCP1* está exacerbada en neutrófilos y en fibroblastos aislados del fluido sinovial de pacientes [348, 349] e incluso se ha usado como un biomarcador de la respuesta a la terapia con tocilizumab [350]. Algunos estudios anteriores al nuestro han analizado el efecto de SNPs en *MCP1* sobre el riesgo de AR [351, 352]. La mayoría de estos estudios se han centrado en una variante potencialmente funcional, *MCP1*<sub>rs1024611</sub> [353, 354], sin embargo observaron una falta de asociación entre dicha variante y la susceptibilidad de AR en la población caucásica [351] y asiática [352, 355]. Nuestros resultados contradicen estas investigaciones previas y muestran efectos protectivos para los SNPs *MCP1*<sub>rs1024611</sub>, *MCP1*<sub>rs13900</sub> y *MCP1*<sub>rs4586</sub> sobre el riesgo a desarrollar AR que parecen estar restringidos a las mujeres. Aunque los estudios previos al nuestro se realizaron en cohortes escasas y podrían no tener suficiente poder estadístico para detectar las mencionadas asociaciones. Nuestros análisis predictivos de funcionalidad mostraron que *MCP1*<sub>rs1024611</sub> altera el lugar de unión de GATA-1 y GATA-2, lo cual soporta nuestra hipótesis sobre el papel que desempeñan estos factores de transcripción en la maduración de los monocitos y de las DCs mediante la regulación de la expresión de *Dectina-2* y *MCP1*. Esta hipótesis biológica requiere ser estudiada más profundamente con ensayos funcionales, así como los resultados de asociación dependiente de género que deben ser clarificados con el análisis de cohortes más extensas.

## **2. Polimorfismos relacionados con la respuesta Th1 y Th2 durante el desencadenamiento de la AR**

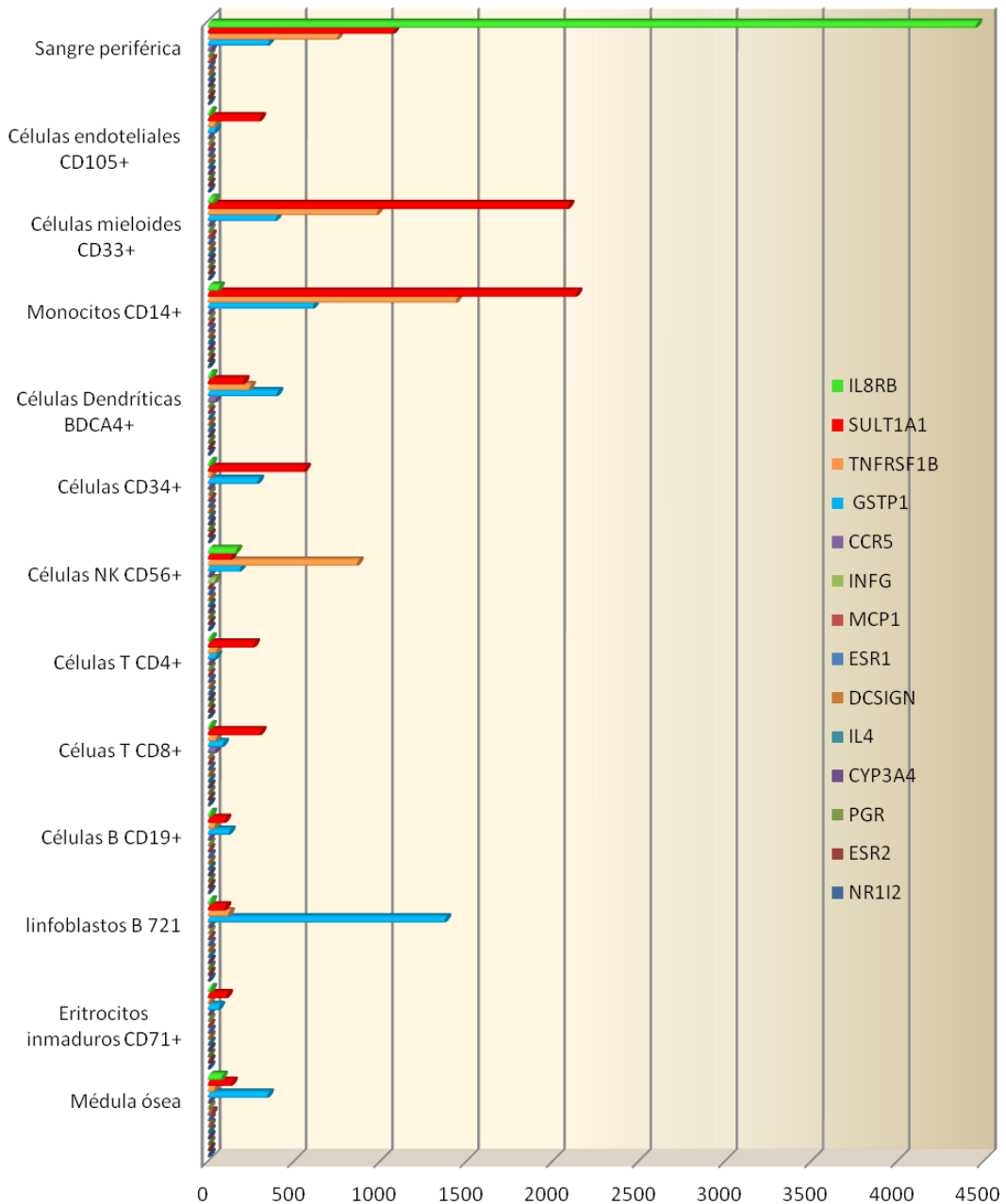
---

Recientes estudios de genes candidato y GWAS han demostrado que SNPs ubicados en genes capaces de modular la respuesta inmune mediada por las células Th1 y Th2 pueden afectar al desarrollo y severidad de la enfermedad [356-359]. En este contexto y dado el papel de las citoquinas proinflamatorias en la AR, recientes estudios han demostrado que SNPs en genes de interleuquinas y sus receptores (*IL4*, *IL4R*, *IL6*, *IL10*) [306, 316-318, 356, 357] o relacionados con el TNFα (*TNF*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *TRAF1-C5*, *TNFAIP3*, *NFKB*) [68, 262, 271, 358, 359] pueden afectar al riesgo de AR. Algunas interleuquinas destacables en la respuesta inmune Th1 y Th2 durante la AR son la IL4 e IL8, ya que promueven la inflamación y la destrucción articular [360-362]. La IL8 está involucrada en la cronicidad de la inflamación e induce la migración celular y la



destrucción articular [363, 364]. Por otro lado, la IL4 inhibe la respuesta inmune mediada por IL8, mientras que induce la respuesta inmune Th1 mediada por IL1 y TNF $\alpha$  [360, 365-367]. Asimismo, el TNF $\alpha$  es una molécula clave en la patogénesis y en el tratamiento de la AR, y algunos autores han sugerido que la presencia de SNPs en *TNFRSF1B* podría afectar al riesgo y progresión de la enfermedad [368-373]. Sin embargo, los resultados publicados hasta la fecha son controvertidos y requieren nuevos estudios en cohortes más extensas.

**Figura 15.** Niveles de expresión clasificados por grupo celular de los genes con las asociaciones más significativas.



*IL8RB*, *SULT1A1*, *TNFRSF1B* y *GSTP1* son las proteínas que más se expresan en sangre. El receptor *IL8RB* presenta una expresión muy alta en sangre, sin embargo en las células inmunes parece expresarse en menor grado, destacando

entre ellas las células NK como el tipo celular con mayor expresión de *IL8RB*. *GSTP1* tiene una expresión bastante alta en la mayoría de las células inmunes, destacando los linfocitos B, las células dendríticas, los monocitos y las células mieloides. *SULT1A1* también posee una alta expresión y los monocitos y las células mieloides son las que mayor grado de expresión poseen de esta enzima; sin embargo, las células progenitoras y los linfocitos T y B también expresan altos niveles de la enzima sulfotransferasa. El receptor *TNFRSF1B* se expresa a altos niveles en las células NK, en los monocitos y en las células mieloides. Por último, *GSTP1* es un aenzima que presenta los más altos niveles de expresión en los linfocitos B, aunque también se expresa mucho en las células dendríticas, los monocitos, las células mieloides y en la médula ósea. El resto de proteínas se expresan a niveles más bajos.

Los resultados de nuestra investigación mostraron asociaciones para dos SNPs en *IL4* (*IL4*<sub>rs2070874</sub> e *IL4*<sub>rs2243250</sub>) con un incremento del riesgo de AR. Estos SNPs se encontraban en *linkage disequilibrium* en nuestra población, lo que sugiere que dichas variantes podrían formar parte de un bloque de LD capaz de afectar a la susceptibilidad de la enfermedad. Además, descubrimos un haplotipo en *IL4* (*IL4*<sub>CCT</sub>) que incrementaba significativamente el riesgo de desarrollar AR en comparación con el haplotipo más común. Nuestros resultados estaban en consonancia con los efectos de SNPs en *IL4* sobre el riesgo de AR publicados anteriormente por otros autores [257, 301-303, 306, 356, 374-376]. Nuestro estudio de meta-análisis con las investigaciones previas validó la asociación entre *IL4*<sub>rs2243250</sub> y un incremento del riesgo de desarrollar la enfermedad. Aunque dicha variante del promotor de *IL4* se ha relacionado con bajos niveles de la citoquina en el suero de los pacientes [356], no pudimos confirmar que influya en la expresión del gen. Sin embargo, y a pesar de la falta de correlación entre los SNPs de *IL4* y los niveles de expresión del ARNm, no podemos descartar que una variante causal en *IL4* pueda influir en los procesos biológicos que afectan al procesamiento del ARNm (*splicing* o *turnover*), su estabilidad o traducción. La *IL4* es una citoquina con una expresión más o menos uniforme en las células inmunes (Figura 15) y una retroalimentación positiva de su propia expresión en linfocitos T [377]. Se han observado diferentes niveles de la proteína *IL4* en distintos tejidos de pacientes de AR, por ejemplo, disminuida en el tejido sinovial [192] y aumentada en el plasma [378, 379]. Esta citoquina posee un papel importante modulando las citoquinas activas durante la respuesta inmune inflamatoria que subyace a la AR. Por ejemplo, numerosos estudios han demostrado que *IL4* disminuye la expresión de *IFNG* en los linfocitos T de sangre periférica [377, 380], de *MCP1* en PBMCs [381], de *DC-SIGN* en células dendríticas [382], del *CCR5* en linfocitos T [383], así como del *TNFRSF1B* [384]. Finalmente, nuestros hallazgos sugieren que existe un bloque de SNPs en la región de *IL4* con un efecto modesto en el riesgo de AR y que resulta interesante realizar investigaciones más extensas sobre el efecto de alguno de estos SNPs en las funciones biológicas de *IL4*.

De otra parte, hemos descubierto SNPs en *IL8RB* y sus haplotipos que también presentaban asociaciones con el riesgo de desarrollar la enfermedad. Los SNPs *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> y *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> incrementaban el riesgo de AR en los modelos de herencia codominante, dominante y log-aditivo, lo que sugiere que un modelo *gene-dosage* está actuando para determinar la susceptibilidad de la enfermedad. Es la primera vez que se describen estos efectos y la carencia de estudios previos nos impidió realizar un meta-análisis que valide nuestros resultados. Sin embargo, observamos que *IL8RB*<sub>rs1126580</sub> y *IL8RB*<sub>rs2230054</sub> estaban en *linkage disequilibrium* en nuestra población y que constituían haplotipos que estaban significativamente asociados al riesgo de la enfermedad. El haplotipo más común, *IL8RB*<sub>CG</sub>, incrementaba significativamente el riesgo de AR, mientras que los haplotipos *IL8RB*<sub>TA</sub> y *IL8RB*<sub>TA</sub> disminuían significativamente el riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, descubrimos un modelo de interacción que incluía variantes en *IL8RB* y *CCR5* que incrementaba el riesgo de AR y que sumado a los resultados anteriores sugiere que *IL8RB* puede afectar a la susceptibilidad de desarrollar AR. Fujikado describió en un modelo animal de AR que la expresión del ARNm de los dos receptores *IL8RB* y *CCR5* está aumentada en el sinovio [385].

Asimismo, J. Auer y R. Nissinen demostraron que existe un incremento de los niveles de ARNm de *CCR5* en los pacientes de AR [386, 387]; aunque, J. Auer también describió que la expresión de *IL8RB* está disminuida en las células polimorfonucleares del fluido sinovial [386]. El receptor *IL8RB* está implicado en numerosos mecanismos biológicos de la respuesta inmune como la apoptosis, la interacción entre las células inmunes, o el tráfico celular (Tabla 9). Finalmente, el conjunto de estos hallazgos y nuestros resultados sugiere que *IL8RB* puede desempeñar un papel en la susceptibilidad a desarrollar AR.

A pesar de que las asociaciones descritas para las variantes en *IL4* e *IL8RB* sólo se acercan al nivel de significancia tras ajustar por el test de comparaciones múltiples, nosotros sugerimos que dichas variantes genéticas podrían desempeñar un papel en la susceptibilidad a la AR. De hecho, numerosos estudios han demostrado que ambas citoquinas, *IL4* e *IL8*, resultan ser grandes mediadores de la inflamación y la destrucción articular durante la enfermedad [360-362]. Dado el papel de *IL8* en la cronicidad de la inflamación y en la destrucción articular [363, 364] y el de *IL4* en la respuesta inmune Th1 [360, 365-367], podemos sugerir que las variantes genéticas capaces de modular la producción o la función biológica de estas citoquinas podrían tener un impacto en el riesgo a desarrollar AR. Soportando esta teoría, la comunidad científica ha descrito numerosos mecanismos mediante los cuales las variantes genéticas intrónicas, promotoras o incluso silentes son capaces de alterar los sitios de unión a factores de transcripción y afectar a la unión, estabilidad o estructura secundaria del ARNm [388-392], a la estructura de la proteína al plegarse [393, 394] o incluso afectando directamente a la función de la proteína [395]. Bajo estas premisas nosotros sugerimos la hipótesis de que las variantes en *IL4* e *IL8RB* podrían modular la expresión de la proteína codificada y, en cierta manera, afectar a la inflamación y a la migración celular mediadas por *IL8*. Sin embargo, es necesario realizar estudios más extensos para descartar la posibilidad de que las variantes descritas se encuentren en *linkage disequilibrium* con otros SNPs funcionales y responsables del incremento del riesgo de AR. Por ejemplo, otros investigadores como Shaw han descrito variantes en *IL8RA*, *IL8RB* y en el pseudogen *IL8RBP* (región 2q34/35) que afectan a la función de *NRAMP1*, un gen que codifica para una proteína de 65 kDa con múltiples funciones en los macrófagos y que induce y cronifica la respuesta inmune activando la producción de  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $iNOS$  (óxido nítrico sintasa inducible) y las moléculas MHC de clase II en las células T  $CD4^+$  [396].

Nuestro estudio analizó una gran cohorte y una selección funcional de variantes que permitió incrementar la probabilidad de identificar SNPs que fuesen biológicamente relevantes para la AR. Aunque nuestros resultados sugieren un efecto modesto de los *loci* en *IL4* e *IL8RB* sobre el riesgo de AR ( $OR=1,23-1,37$ ), este trabajo tenía suficiente poder estadístico para detectar efectos pequeños. Basandonos en las frecuencias genotípicas observadas en nuestra población, tuvimos un poder estadístico del 80% para detectar una  $OR$  de 1,33 ( $\alpha=0,0003$ ) para un polimorfismo con una frecuencia alélica mínima de 0,25 (modelo log-aditivo).

Por otro lado y dada la importancia de la vía del  $TNF\alpha$  en la enfermedad, investigaciones previas a la nuestra han asociado variantes en el receptor II del  $TNF\alpha$  (*TNFRSF1B*) con la susceptibilidad a la AR [368-373]. Sin embargo, la mayoría de estos estudios muestran resultados contradictorios, por lo que hemos investigado el papel de las variantes en *TNFRSF1B* sobre el riesgo de AR. Nuestros resultados mostraron una asociación estadísticamente significativa para *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> con un incremento del riesgo de AR que, además de superar el test por comparaciones múltiples, resultó ser independiente del FR y, asimismo, *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> también formaba parte de un haplotipo que aumentaba el riesgo de la enfermedad. Estos resultados sugieren que el genotipado conjunto de esta variante y otros biomarcadores bien establecidos podría ayudar a mejorar la

predicción del riesgo de desarrollar la enfermedad. Los resultados publicados previamente por Bayley [373] discrepaban de los nuestros, aunque la disparidad entre ambos estudios podría deberse al distinto tamaño de cohorte ( $n_{\text{Bayley}}=498$  vs.  $n=2637$ ) y, además, la potencia estadística de nuestro trabajo permitía detectar efectos pequeños. Nuestro estudio presentó un 80% de poder para detectar una OR de 1,27 ( $\alpha=0,0025$ ) para un SNP con una frecuencia mínima alélica de 0,25 (para el modelo log-aditivo). Ninguna otra variante del *tagging* de *TNFRSF1B* resultó asociada a la susceptibilidad de la AR, y ésto sumado a la falta de asociación de los haplotipos comunes sugiere que el haplotipo que incrementaba el riesgo de la enfermedad (*TNFRSF1B*<sub>GGCG</sub>) probablemente debía su efecto a la variante *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub>. Dicho SNP forma parte de un haplotipo en la región 3'-UTR de *TNFRSF1B* que fue descrito por el Dr. Puga y sus colaboradores como un haplotipo capaz de aumentar la inestabilidad del ARNm [397]. La presencia del alelo *TNFRSF1B*<sub>rs3397C</sub> disminuye la capacidad del haplotipo de mermar la estabilidad del ARNm, lo cual se traduce en un incremento de la respuesta inmune y de la inflamación mediadas por TNFRSF1B. Igualmente, Fujikado demostró que la expresión del ARNm de *TNFRSF1B* está aumentada en un modelo animal de AR [385], efecto que ha sido confirmado por varias investigaciones en el suero y en las células T de pacientes [371, 398-400](Figura 16). En base a estos resultados, podemos sugerir que *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> provoca una respuesta inmune incontrolada de la vía del TNF $\alpha$  y, por tanto, aumenta la susceptibilidad de enfermedades crónicas inflamatorias como la enfermedad de Crohn [401] o la AR.

Finalmente, otra variante de *TNFRSF1B* muy estudiada en el ámbito de la AR es *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> [368-370, 372, 402, 403]. Los efectos de esta variante sobre el riesgo de la enfermedad descritos hasta la fecha son contradictorios, y nuestros resultados de falta de asociación sólo coinciden con parte de las investigaciones previas [369, 402]. La causa de estas discrepancias puede deberse al diferente tamaño de la población de estudio empleada en cada investigación. Para esclarecer el efecto de esta variante sobre la susceptibilidad a la AR, desarrollamos un estudio de meta-análisis en el que incluimos a un total de 7473 individuos y que validó la ausencia de efecto de *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> sobre el riesgo de esta enfermedad. Así, nuestros resultados confirman que la variante *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> no está asociada con el riesgo de desarrollar la enfermedad en europeos caucásicos. Aunque intentamos evaluar la asociación de ambas variantes (*TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub>) con el riesgo de AR combinando los datos de estudios de asociación de genes candidato con los de GWAS, no encontramos datos de genotipado disponibles. Sin embargo, los datos disponibles sugieren que *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> no juega un papel relevante en la etiopatogenia de la AR.

### **3. Implicación de los SNPs en genes relacionados con las hormonas esteroideas en el riesgo a desarrollar AR**

---

Está demostrado que las hormonas esteroideas también están implicadas en la modulación de la respuesta inmune y en la evolución de la AR [65-67]. Por ejemplo, la CYP3A4 es una de las principales y más frecuentes enzimas que catalizan la oxidación de las hormonas esteroideas endógenas o exógenas y afecta a la concentración de estriol, el cual disminuye la expresión de *IFNG* a través de ESR1 [404, 405]. El ESR1 es también capaz de disminuir la expresión de la quimioquina MCP1 [406, 407]. A su vez, ESR1 es capaz de regular su propia expresión y la de *ESR2* [408], así como de formar un heterodímero con ESR2 que modula la transcripción de otros genes (*VEGF*)[409]. Igualmente, SULT1A1 es una sulfotransferasa que puede modular la concentración de los distintos metabolitos que se unen a los receptores ESR1, ESR2 y NR1I2, pudiendo influir de

manera indirecta en la acción que ejercen estas tres moléculas en el transcurso de la enfermedad mediante la modulación hormonal de la respuesta inmune.

Nuestros resultados mostraron que los polimorfismos *ABCB1*<sub>rs1045642</sub>, *CYP2C19*<sub>rs4244285</sub>, *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> y *PGR*<sub>rs518162</sub> estaban asociados con un incremento del riesgo de AR, mientras que la variante *CYP2C9*<sub>rs1057910</sub> estaba asociada a una disminución del riesgo de la enfermedad. La asociación más relevante fue la mostrada por *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> que incrementaba en casi 4 veces el riesgo de desarrollar AR. Además, los análisis estratificados por FR demostraron que el efecto de esta variante sobre la susceptibilidad de la enfermedad fue mayor en los pacientes seronegativos. La asociación entre *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> y el riesgo de AR en pacientes seronegativos superó el test de comparaciones múltiples, lo cual sugiere que el *locus CYP3A4* al menos posee un efecto modesto sobre la susceptibilidad de la AR. Asimismo, descubrimos que el haplotipo *CYP3A4*<sub>GC</sub> también incrementaba el riesgo de la enfermedad. Aunque dicho haplotipo no incluía el alelo de riesgo *CYP3A4*<sub>rs11773597C</sub> y su asociación no superó el test de comparaciones múltiples, nosotros sugerimos que la presencia del SNP *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> o de un haplotipo que incluya las variantes *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> y *CYP3A4*<sub>rs2740574</sub> podría influir en la susceptibilidad de la enfermedad.

La enzima CYP3A4 está codificada por un gen polimórfico en el cual las variantes genéticas condicionan la variabilidad en la expresión [410, 411] y en la actividad enzimática [411, 412] y, además, los SNPs del gen *CYP3A4* pueden encontrarse en *linkage disequilibrium* con variantes de otros genes colindantes que codifican para enzimas de la misma familia (*CYP3A5*, *CYP3A7* y *CYP3A43*)[413]. El SNP *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> está en la región 5' no traducida del gen (5'-UTR) y podría ser capaz de modular la expresión del ARNm de los genes *CYP3A* o la actividad enzimática de la proteína, ya sea por sí solo o formando parte de un haplotipo específico, lo cual sugiere que *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> podría influir en el balance positivo de metabolitos proinflamatorios de las hormonas esteroideas e incidir en la respuesta inmune y, consecuentemente, en la susceptibilidad a la AR. De hecho, existen estudios que correlacionan ciertos SNPs en *CYP3A4* con los niveles hepáticos de esta proteína [414] y con hormonas esteroideas inductoras de cáncer [415-417]. Además, variantes genéticas ubicadas en otros genes (*NR1I2*, *FoxA2*, *FoxA3*, *ABCB1* y *HNF4α*) también se han relacionado con los niveles hepáticos de la enzima CYP3A4 [414]. Hasta lo que a nuestro conocimiento concierne, esta es la primera vez que se describe el efecto de la variante *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> sobre la susceptibilidad de AR y, soportando nuestra teoría, hemos descubierto que dicho SNP correlaciona con los niveles de expresión del ARNm de *TRIM4*. La sobreexpresión de *TRIM4* activa las vías del NFKB e IFN, y además, un reciente meta-análisis de GWAS ha demostrado que el gen *TRIM4* tiene un papel en la modulación de los niveles de las hormonas esteroideas [418]. Estos mecanismos podrían explicar, al menos en parte, la implicación de *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> en el riesgo de la AR a través de la modulación de la respuesta inmune mediada por *TRIM4*. Aunque no podemos asegurar que *CYP3A4*<sub>rs11773597</sub> sea una variante causal, nuestro trabajo sugiere que un mapeo genético más profundo de esta región y una mejor caracterización del papel funcional de los SNPs y haplotipos en *CYP3A4* podrían ayudar a identificar las variantes causales de los efectos observados.

#### **4. Capacidad predictiva de las variantes genéticas en el fracaso terapéutico de la terapia con fármacos anti-TNFα**

Recientes estudios de genes candidato y GWAS han demostrado que SNPs ubicados en genes implicados en la respuesta inmune pueden afectar a la respuesta al tratamiento de la enfermedad [298, 319]. Por otra parte, el desequilibrio entre citoquinas pro y anti-inflamatorias en el sinovio y

en el tejido adyacente de los pacientes con AR [192, 196] ha sido el objetivo de muchas investigaciones y de las terapias biológicas para frenar la actividad de la enfermedad. Por ejemplo, el IFNG es la proteína más descrita en la bibliografía y se ha descrito que el desbalance en la producción de esta citoquina por parte de las células T promueve la respuesta inmune mediada por las células Th1 (Tabla 9)[419] y aumenta la expresión de *MCP1* en monocitos, macrófagos, neutrófilos y PBMCs [381, 420-424]. Incluso, dado el papel de esta citoquina en la AR, recientemente se han llevado a cabo ensayos clínicos en los cuales el IFNG se ha usado como un biomarcador de la respuesta a la terapia con Tocilizumab [425].

Nosotros en particular hemos descubierto que los pacientes portadores del alelo *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> tenían mayor probabilidad de responder favorablemente al tratamiento biológico con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Asimismo, Bank y colaboradores también describieron recientemente otro SNP en *INFG* asociado a un fracaso de la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$  [426], por lo que podemos sugerir que las variantes genéticas implicadas en la modulación de la respuesta inmune mediada por INFG podrían afectar a la respuesta al tratamiento con biológicos anti-TNF $\alpha$ . El IFNG tiene una expresión uniforme en las células del sistema inmune y una expresión muy elevada en las células NK CD56+ (Figura 15). La producción del *IFNG* está sistemáticamente aumentada en el sistema inmune de los pacientes y puede influir en las complicaciones de esta enfermedad [350]. En el sinovio de los pacientes de AR existe un incremento de la síntesis del ARNm de *IFNG* así como del número de células T secretoras de esta citoquina [348, 427]. El IFNG es capaz de incrementar la expresión de *DC-SIGN* en la membrana de las células presentadoras de antígenos [428] y en linfocitos T [429], mientras que podría disminuir su expresión en monocitos [430]. De la misma manera, el INFG es capaz de incrementar la expresión de *CCR5*, interacción que fue descrita en 1999 en fagocitos mononucleares y que se ha corroborado en modelos animales más actuales [431, 432]. Por otro lado, el INFG también podría afectar al metabolismo de las hormonas esteroideas, pues se ha observado en un modelo animal que el *IFNG* es capaz de disminuir la expresión de la enzima CYP3A4 [433], lo cual podría afectar a la regulación que ejercen las hormonas esteroideas sobre la respuesta inmune (Figura 16). Asimismo, H.L. Dickensheets describió que el IFNG es capaz de menguar la expresión de *TNFRSF1B* en la membrana celular de los monocitos CD14+ [434](Figura 16). El *TNFR2* está muy expresado en las células inmunes, siendo los monocitos CD14+ y las células mieloides CD33+ los grupos celulares con mayor expresión de *TNFRSF1B* (Figura 15). El hecho de que el INFG disminuya la expresión de *TNFR2* apoya nuestros resultados de asociación del *INFG* a una mejor respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ , pues una respuesta favorable es más factible ante una expresión disminuida de *TNFRSF1B*. Basándonos en nuestros resultados, nosotros sugerimos que aquellos portadores del alelo *IFNG*<sub>rs2069705C</sub> en el promotor del gen podrían tener disminuida la expresión de *IFNG* y tendrían reducida la respuesta inmune mediada por *IFNG* y, consecuentemente, sería más efectivo el bloqueo de la respuesta inmune dependiente de TNF $\alpha$  que provoca la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ . No obstante, resulta necesario realizar estudios más profundos capaces de esclarecer el posible rol de estas variantes en la respuesta al tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$ . Además, biológicamente existe una regulación entre IFNG e IL4, las cuales tienen efectos contrarios en la inflamación pues el IFNG media la vía Th1 e IL4 la vía Th2 [435]. La disparidad entre ambas citoquinas concuerda con nuestros resultados que también muestran efectos contrarios, pues en *IL4* vimos asociaciones al riesgo de AR y en *IFNG* un efecto protector ante el fracaso terapéutico.

Por otro lado, la molécula TNF $\alpha$  resulta clave en el tratamiento de la AR, por lo que muchos investigadores han enfocado sus estudios en la vía del TNF $\alpha$  descubriendo nuevas variantes asociadas a la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  [292, 296-299, 436]. De hecho, investigaciones previas a la nuestra han asociado variantes en el receptor II del TNF $\alpha$  (*TNFRSF1B*) con la respuesta

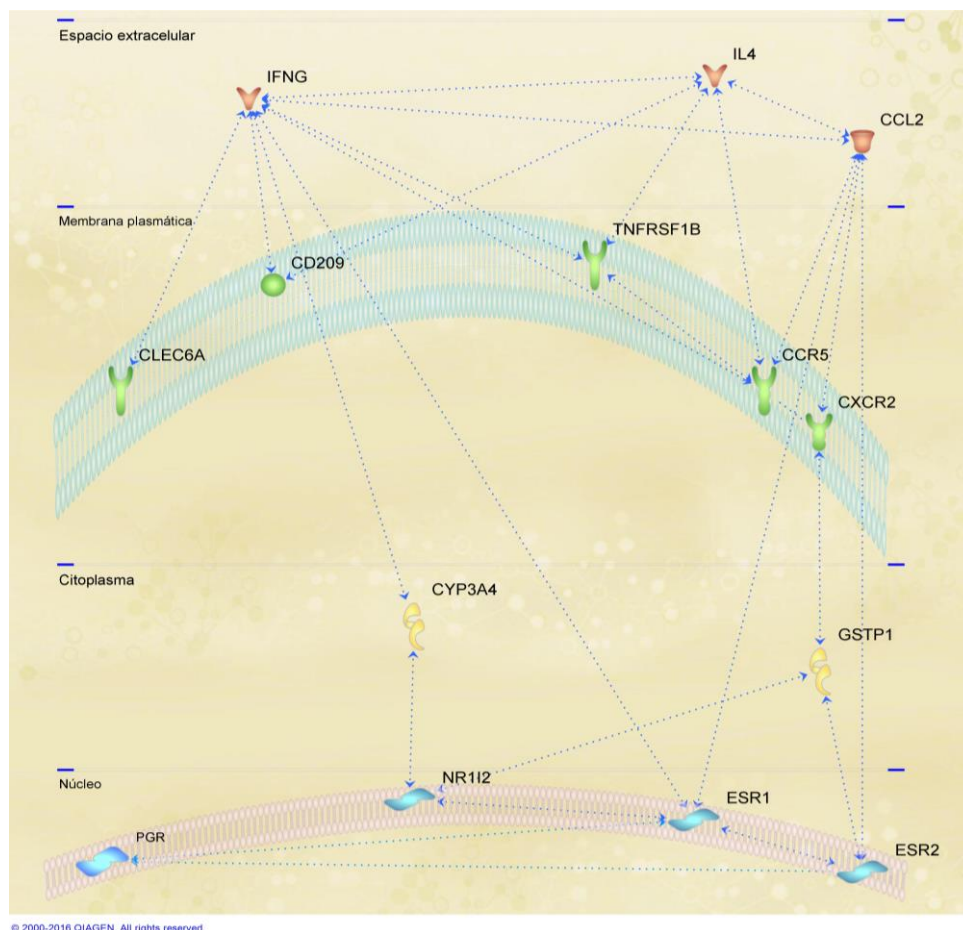


al tratamiento anti-TNF $\alpha$  [294, 437-439]. Por nuestra parte, hemos descubierto que los SNPs *TNFRSF1B*<sub>rs1061631</sub>, *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> incrementaban el riesgo de fracaso terapéutico. Los efectos mostrados por *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> resultaron estadísticamente significativos en el modelo log-aditivo, lo cual sugiere que estas variantes mostraban un efecto dependiente del alelo. Además, descubrimos un haplotipo común que sólo incluía el alelo de riesgo de *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> (GACT), no así para las otras dos variantes mencionadas, y que también incrementaba el riesgo de fracaso terapéutico. Basándonos en los hallazgos funcionales de *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> sobre la modulación de la estabilidad del ARNm y en la exacerbación de la respuesta inmune mediada por *TNFRSF1B* [397], sugerimos que la presencia de esta variante puede influir en la respuesta terapéutica a los fármacos anti-TNF $\alpha$ .

Estudios previos al nuestro identificaron una asociación entre *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> y un mayor riesgo de fracaso al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  [294, 437]. Nosotros obtuvimos resultados consonantes con dichas investigaciones cuando incluimos los pacientes con respuesta moderada en el análisis en combinación con los “buenos-respondedores”. Sin embargo, un meta-análisis conjunto de nuestro trabajo y los estudios previos [294, 319, 440] reveló una falta de asociación entre *TNFRSF1B*<sub>rs1061622</sub> y la respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ . Por otro lado, los análisis de asociación de los SNPs con la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$  combinando los “respondedores moderados” con los “buenos-respondedores” confirmaron los efectos descritos para *TNFRSF1B*<sub>rs1061631</sub> y *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub>. El *TNFRSF1B* está implicado en numerosos procesos relevantes en la respuesta inmune inflamatoria como la apoptosis, la activación de linfocitos y DCs, la proliferación y diferenciación de los linfocitos o el tráfico celular (Tabla 9). Basándonos en nuestros resultados y en los hallazgos de Puga [397], podemos mantener la hipótesis de que la variante *TNFRSF1B*<sub>rs3397</sub> puede modular la respuesta al tratamiento anti-TNF $\alpha$ . Pero, dado que ninguno de los efectos descritos para los SNPs en *TNFRSF1B* superó el test de comparaciones múltiples, nuestros hallazgos, aunque interesantes, requieren ser validados en cohortes más extensas e independientes.

La vía de las hormonas esteroideas también influye en la respuesta al tratamiento de la enfermedad ya que puede modular la respuesta inmune y afecta al metabolismo de los xenobióticos. Los receptores de las hormonas esteroideas se expresan ubicuamente en las células inmunes y son una pieza clave en esta vía. El ESR2 es un receptor capaz de disminuir la expresión de *MCP1* [441] y de *GSTP1* [442]. Además, existe una regulación biológica intrínseca entre algunos receptores como ESR1, ESR2 y PGR y la expresión de sus correspondientes genes [443-446]. Por ejemplo, ambos receptores ESR1 y ESR2 poseen un ERE en el gen *PGR* a través del cual modulan la expresión del mismo [443, 447-450]. Por otro lado, NR1I2 es un receptor nuclear dependiente de ligando que también estimula la expresión de *CYP3A4* [433, 451] pero, en cambio, modula negativamente la expresión de *GSTP1* [452]. Las enzimas de las hormonas esteroideas también son fundamentales para los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas sobre el sistema inmune y los fármacos. Por ejemplo, *GSTP1* es una enzima localizada a nivel citoplasmático que está muy expresada en las células inmunes a nivel de la médula ósea y en sangre periférica. Los linfocitos B son las células que mayor expresión de *GSTP1* registran, aunque las DCs y los monocitos también la expresan a altos niveles (Figura 15). Como hemos visto, la expresión de *GSTP1* puede estar disminuida por ESR2 y NR1I2 y, además, los patrones de máxima expresión de las tres moléculas coinciden en los mismos grupos celulares (Figura 15).

**Figura 16.** Conexión biológica entre las moléculas codificadas por los genes con las asociaciones más relevantes mencionadas en la discusión.



Nuestros análisis de respuesta para SNPs ubicados en genes relacionados con el metabolismo, transporte y señalización de las hormonas esteroideas mostraron asociaciones para variantes en los genes *CYP1B1*, *ESR2*, *GSTP1* y *NR1I2* con el fracaso terapéutico de los fármacos anti-TNF $\alpha$ . Los genes *ESR2* y *GSTP1* mostraron efectos marginalmente significativos que se mantenían tanto individualmente como formando un haplotipo, e incluso cuando los pacientes “respondedores moderados” se incluyeron en los análisis. Las variantes *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *ESR2*<sub>rs4986938</sub> mostraron efectos marginalmente significativos tras la corrección por el test de comparaciones múltiples, resultando ser el efecto de *ESR2*<sub>rs1255998</sub> un efecto dependiente del alelo. Asimismo, descubrimos que los haplotipos *ESR2*<sub>GCC</sub>T y *GSTP1*<sub>TG</sub> estaban asociados con una respuesta favorable al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$ , efectos que se mantenían cuando agrupamos los pacientes “respondedores moderados” junto con los “no-respondedores”. Los SNPs *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *ESR2*<sub>rs4986938</sub> se encuentran en la región 3'-UTR del gen, una región reguladora que puede influir en la traducción o en la estabilidad del ARNm [453-455]. De hecho, hemos descubierto que los tres SNPs de las regiones UTR de *ESR2* que resultaron asociados al fracaso terapéutico también correlacionan fuertemente con la expresión del ARNm, lo cual sugiere que dichas variantes pueden modular los niveles de la proteína ESR2. Además, aunque la falta de datos nos impidió validar a todos los potenciales marcadores de respuesta, el meta-análisis con el estudio DREAM confirmó que las variantes *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *PGR*<sub>rs518162</sub> provocaban un impacto negativo en la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$ . La variante *PGR*<sub>rs518162</sub> modula la regulación de las histonas, modifica el lugar de unión de factores de transcripción (POL2, FOXA1, GATA3, TAF1, TBP,

EGR1, DNRT7 y RREB-1)[456, 457]. Estos datos sumados a los efectos de las variantes de *ESR2* sobre los niveles de ARNm sugieren que *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *PGR*<sub>rs518162</sub> podrían modular el sistema inmune y afectar a la respuesta anti-TNF $\alpha$  a través de mecanismos dependientes de los estrógenos.

Los genes *ESR2* y *PGR* se localizan en los cromosomas 14q23.2 y 11q22-q23 y codifican para el receptor beta de estrógenos (*ESR2* o *ESR $\beta$* ) y el receptor de la progesterona (*PGR*), respectivamente. Ambos receptores se expresan en las células sinoviales [458], en el hueso [459] y en la mayoría de las células inmunes [458, 460](Figura 15). Resulta interesante que estos receptores interactúan entre ellos pues *ESR2* es capaz de unirse al gen *PGR* y modular su transcripción [461]. *ESR2* provoca un incremento en la expresión de *PGR* que justifica que los resultados del meta-análisis muestren un impacto similar de los SNPs *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *PGR*<sub>rs518162</sub> sobre la variación del DAS28 en los pacientes con terapia biológica anti-TNF $\alpha$ . Además, la progesterona regula el papel protector que provoca un exceso de estrógenos frente a la AR, protegiendo a las articulaciones y manteniendo la densidad ósea [62, 462-464]. En cambio, bajos niveles de estrógenos o progesterona incrementan la severidad de la enfermedad y su aparición [465-468]. Algunos estudios experimentales sugieren que los estrógenos modulan las repuestas inmunes Th1 y Th2 en la AR, ya sea a través de los EREs o interactuando con factores de transcripción (NFKB y API)[208], mientras que la progesterona activa la respuesta inmune mediada por las células Th1 y Th2. Los estrógenos modulan numerosos mecanismos implicados en la inmunidad como la maduración de los timocitos [469], el tráfico celular [470], la proliferación de los linfocitos B y T [471] y la expresión de proteínas de adhesión [471](Tabla 9). Asimismo, los estrógenos pueden activar a las células B mediante la supresión de la respuesta inmune mediada por las células T e inhibiendo la apoptosis de las células B autoreactivas [472], y también estimulan la respuesta Th2 [473] mientras que inhiben a las células Th17 [237], las cuales son determinantes en la autoinmunidad tanto sistémica como específica de tejido. La modulación de la respuesta Th17 ejercida por *ESR2* y *PGR* ha sido demostrada por estudios experimentales en ratones con los ovarios extirpados y una AR inducida. Los resultados de estos estudios demuestran que la administración de estrógenos y progesterona reduce el número de células productoras de IL17 y de neutrófilos en las articulaciones, provocando una rápida remisión de la enfermedad [237]. Finalmente, *ESR2* provoca un incremento en la expresión de *PGR* que justifica que los resultados del meta-análisis muestren un impacto similar de sus SNPs sobre la variación del DAS28 al evaluar la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$ .

El *ESR2* se encuentra sobreexpresado en el sinovio de los pacientes [224]. Además, las principales citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 inducen un desbalance positivo de los metabolitos de estrógenos proinflamatorios [218, 222] capaces de interactuar con *ESR2*, por lo que esta vía podría jugar un papel en la cronicidad de la respuesta inmune inflamatoria. El desbalance positivo de estrógenos frente a andrógenos que tiene lugar en la AR promueve la respuesta inmune mediada por las células Th2. Al igual que *Dectina-2*, el E2 es capaz de inducir la vía NFKB de manera dosis dependiente, por ejemplo en el embarazo se induce la síntesis de TNF $\alpha$  y se inhibe en la menopausia, por lo que una variación en los niveles de expresión de los receptores esteroideos podría influir en los efectos del E2. Basándonos en estos datos, formulamos la hipótesis de que *ESR2*<sub>rs1255998</sub> y *ESR2*<sub>rs4986938</sub> aumentan la expresión de *ESR2*, el cual podría ser activado por el desbalance positivo de estrógenos presente en el sinovio durante la inflamación y, en consecuencia, podría impulsar la activación de la vía NFKB e inducir una mayor secreción de TNF $\alpha$  que dificultaría la eficacia del tratamiento biológico anti-TNF $\alpha$ . Además, nuestra hipótesis también se soporta con el haplotipo de *ESR2* asociado a una buena respuesta ya que está compuesto por los alelos que correlacionan con una menor expresión del ARNm, lo cual implica

una síntesis disminuída del receptor y menor estimulación de la vía NF $\kappa$ B. Además, ESR2 es capaz de inhibir a ESR1, el cual si podría aminorar la inflamación al inhibir la vía NF $\kappa$ B (Figura 16). Laffont ha demostrado que la activación de los REs en las células dendríticas plasmacitoides provoca un incremento de la respuesta a los estímulos de los TLR7 y TLR9 que es independiente del sexo, lo cual coincide con nuestra falta de resultados dependientes de género [474]. Además, el estímulo del TLR7 provoca una activación de las vías NF $\kappa$ B e IRF5 que conlleva una mayor producción de INF $\gamma$  y de citoquinas proinflamatorias, respectivamente. Este mecanismo esta potenciado por la estimulación de los REs y, además, en mujeres este tipo de respuesta es mayor que en hombres, lo cual sugiere que ésta podría ser una de las vías de acción para generar una respuesta inmune diferente entre ambos sexos en la patogénesis de la AR.

## 5. *Aportación de los modelos predictivos a la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$*

---

Un nuevo enfoque está surgiendo en los estudios de farmacogenómica con el desarrollo de modelos que permitan predecir la respuesta a los diferentes tipos de tratamiento de la AR. Sin embargo y a pesar de la identificación de variantes genéticas implicadas en la respuesta terapéutica [293, 298, 316-319], aún no ha sido posible trasladar a la clínica la mayor parte de los descubrimientos en este área. Los modelos predictivos con marcadores genéticos son aún escasos y requieren de validación, pero su capacidad predictiva parece ser mayor que la de los modelos que carecen de ellos [322, 323]. Un ejemplo que apoya esta afirmación lo constituye el modelo predictivo desarrollado por Wessels y colaboradores (2007) y en el que contemplan el uso de cuatro marcadores genéticos junto a otras variantes clínicas y ambientales para predecir la respuesta al tratamiento con metotrexato [324]. El modelo predictivo más completo en cuanto al número de marcadores genéticos incluidos (46 *loci* asociados con AR) es el desarrollado por A. Yarwood en 2015. Sin embargo, dicho modelo tiene aún una capacidad predictiva modesta [325]. Aunque los modelos predictivos desarrollados hasta la fecha son aun unos resultados muy preliminares, sugieren que la identificación de nuevos modelos más completos que integren marcadores genéticos con mayor capacidad predictiva podría ayudar clínicamente a alcanzar el objetivo de una respuesta terapéutica favorable [322-325].

Finalmente, nosotros descubrimos un modelo predictivo que al incorporar 5 variantes genéticas en *ESR2*, *CYP1B1*, *NR1I2* y *GSTP1* mejoraba notablemente la capacidad predictiva de respuesta al tratamiento con fármacos anti-TNF $\alpha$  al compararlo con otro modelo que sólo incluya variables clínicas y demográficas. El área bajo la curva (AUC) del modelo genético fue un 9% superior que el AUC del modelo de referencia, lo cual sugiere que SNPs en genes relacionados con la señalización, el metabolismo de fase I y II y el transporte de las hormonas esteroideas podrían ayudar en la predicción de la respuesta a la terapia con fármacos anti-TNF $\alpha$  en la AR. Cabe destacar que permanecen en el modelo justamente SNPs que por sí solos también muestran un efecto y que podrían influir en el metabolismo de las hormonas esteroideas y en la modulación de la transcripción. Tanto *GSTP1*, como *ESR2* y *NR1I2* mostraron efectos de asociación a la respuesta al tratamiento y, además, existe una conexión biológica entre dichas moléculas que modula la expresión de las mismas. La expresión de *GSTP1* está modulada negativamente por *ESR2* [442] y *NR1I2* [452] y, además, los patrones de máxima expresión de las tres moléculas coinciden en los mismos tipos de células inmunes (Figura 15). Estos datos podrían justificar, al menos en parte, una acción conjunta de las 3 moléculas en la respuesta al tratamiento y en el incremento de la capacidad predictiva al incorporar variantes genéticas de los 3 *loci* en un modelo predictivo de respuesta.

NR1I2 es un receptor nuclear que actúa como un factor de transcripción (también conocido como *Pregnane X* o *PXR*) y se une a un ERE en el promotor de *CYP3A4* regulando la expresión de dicha enzima, de hecho otros autores han descrito SNPs en *NR1I2* relacionados con una modulación irregular de *CYP3A4* [475]; lo cual sugiere que variantes en *NR1I2* podrían afectar al metabolismo de los estrógenos y consecuentemente a la inmunidad mediada por los mismos. Además, *NR1I2* también es capaz de regular la expresión de *ABCB1* [452], un transportador de membrana de las hormonas esteroideas y en donde observamos efectos moderados sobre la susceptibilidad a la AR. Por otro lado, *GSTP1* es una enzima involucrada en el metabolismo de los estrógenos capaz de crear metabolitos activos al añadir un grupo sulfato a los mismos. El SNP que hemos visto asociado a la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$  (*GSTP1*<sub>rs1695</sub>) codifica para un cambio de aminoácido (I105V) y está relacionado con una actividad de la enzima disminuida [476], por lo que podemos deducir que esta variante puede estar implicada en una alteración de los niveles de los metabolitos de estrógenos proinflamatorios repercutiendo entonces en la respuesta al tratamiento. Nuestros resultados parecen indicar que existe una conexión entre una alteración de la transcripción de *GSTP1* que repercute en el metabolismo de los estrógenos y que podría tener un papel en la susceptibilidad a la AR y en la respuesta a la terapia anti-TNF $\alpha$ .

Dado el relevante valor predictivo de los SNPs incluidos en el modelo genético, resulta interesante su validación junto con otros marcadores previamente implicados en la determinación de la respuesta terapéutica anti-TNF $\alpha$  [293, 296-299, 319, 477] en estudios más ambiciosos que ayuden a personalizar las estrategias de tratamiento en la AR.

**Tabla 9.** Nivel de asociación de las moléculas con funciones biológicas descritas en la patogénesis de la AR.

Categoría	Función	Tipo celular	P-valor	Moléculas implicadas
Muerte celular	apoptosis		4, 02E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, CYP3A4, ESR1, ESR2, GSTP1, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
	muerte de monocitos		3, 03E-06	CCR5, IFNG, IL4
Interacción y señalización celular	unión celular	Leucocitos	4, 57E-09	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4
		Fagocitos	2, 70E-08	MCP1, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4
		células endoteliales	7, 94E-07	MCP1, IL8RB, IFNG, IL4
	activación de células inmunes	Leucocitos	2, 78E-08	MCP1, DC-SIGN, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		linfocitos T	6, 21E-07	DC-SIGN, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		fagocitos	8, 31E-07	MCP1, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		células dendríticas	1, 08E-06	DC-SIGN, IFNG, IL4, TNFRSF1B
	adhesión de células inmunes	leucocitos	1, 45E-06	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		granulocitos	1, 64E-06	MCP1, IL8RB, IFNG, IL4
		fagocitos	7, 97E-08	MCP1, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4
	células inmunes		3, 52E-07	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4
	células		7, 52E-07	MCP1, IL8RB, IFNG, IL4

		endoteliales vasculares		
		linfocitos	1, 37E-06	MCP1, DC-SIGN, IFNG, IL4
	Interacción	linfocitos T	3, 16E-07	CCR5, DC-SIGN, IFNG, IL4
	transducción de la señal		3, 18E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, ESR1, ESR2, IFNG, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
	comunicación celular		3, 24E-08	MCP1, CCR5, IL8RB, ESR1, ESR2, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
Proliferación celular	Proliferación	linfocitos T	2, 95E-07	MCP1, CCR5, DC-SIGN, ESR1, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		leucocitos	9, 03E-08	MCP1, CCR5, DC-SIGN, ESR1, GSTP1, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		progenitores de células hematológicas	6, 11E-07	MCP1, GSTP1, IFNG, IL4, TNFRSF1B
	Generación	linfocitos T	3, 63E-08	IFNG, IL4, PGR
		linfocitos Th9	1, 39E-06	IFNG, IL4
	Diferenciación	leucocitos	2, 62E-07	MCP1, CLEC6A, IL8RB, IFNG, IL4, PGR, TNFRSF1B
		linfocitos T	1, 72E-06	CLEC6A, IL8RB, IFNG, IL4, PGR, TNFRSF1B
ADN y expresión génica	daño al AND		1, 39E-06	CCR5, IFNG
	ligamiento a sitio de unión específico	unión al ADN	8, 66E-10	CYP3A4, ESR1, ESR2, GSTP1, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
		proteínas de unión	7, 46E-09	ESR1, ESR2, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
		Sp1	4, 49E-08	ESR1, ESR2, IFNG, IL4
		NFkB	6, 29E-08	ESR1, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		AP1	5, 38E-07	ESR1, ESR2, IFNG, IL4
		ERE	1, 40E-06	ESR1, ESR2, PGR
		STAT	2, 73E-06	ESR1, IFNG, IL4
	Transactivación	ARN	8, 95E-08	ESR1, ESR2, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
	Transcripción	ARN	1, 13E-07	MCP1, CCR5, ESR1, ESR2, GSTP1, IFNG, IL4, NR1I2, PGR, TNFRSF1B
Respuesta inmune humoral	Cantidad	inmunoglobulinas	2, 03E-10	CCR5, IL8RB, ESR1, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		linfocitos B	1, 19E-09	IL8RB, ESR1, ESR2, GSTP1, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		IgG	1, 45E-07	CCR5, ESR1, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		IgG1	7, 52E-07	CCR5, IFNG, IL4, TNFRSF1B
	class switching		1, 40E-07	ESR1, ESR2, IFNG, IL4
Tráfico celular	tráfico células	linfocitos T	9, 92E-09	MCP1, CCR5, IL8RB, ESR2, IFNG, IL4
	immunes	linfocitos	4, 28E-12	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, ESR1, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B
		macrófagos derivados de la médula ósea	7, 69E-07	MCP1, CCR5, IFNG

		células dendríticas	1, 11E-09	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4	
		fagocitos	4, 44E-07	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		macrófagos derivados de la médula ósea	7, 69E-07	MCP1, CCR5, IFNG	
Infiltración		leucocitos	1, 55E-09	MCP1, CCR5, IL8RB, ESR1, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		linfocitos T	3, 38E-07	CCR5, ESR2, IFNG, IL4	
		linfocitos	8, 11E-10	MCP1, CCR5, ESR1, ESR2, IFNG, IL4	
Quemotaxis		linfocitos T	3, 85E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, IL4	
		células dendríticas	1, 04E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG	
		fagocitos	2, 24E-06	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG, IL4	
		células mieloides	2, 52E-06	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG, IL4	
reclutamiento celular		leucocitos	1, 64E-08	MCP1, CCR5, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		fagocitos	2, 77E-08	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		linfocitos	3, 72E-07	MCP1, CCR5, IFNG, IL4	
		macrófagos	6, 94E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG	
		células mieloides	7, 10E-07	MCP1, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		granulocitos	4, 45E-07	MCP1, IL8RB, IL4	
Migración		linfocitos	7, 47E-11	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B	
		fagocitos	7, 76E-08	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IL8RB, IFNG, IL4	
		células presentadoras de antígenos	1, 42E-07	MCP1, CCR5, DC-SIGN, IFNG, IL4	
		células dendríticas	1, 10E-06	MCP1, DC-SIGN, IFNG, IL4	
Enfermedad immune		cantidad anormal	7, 01E-09	ESR1, ESR2, IFNG, IL4	
		síndrome autoinmune sistémico	2, 77E-08	MCP1, CCR5, CLEC6A, IL8RB, ESR1, IFNG, IL4, PGR, TNFRSF1B	
		enfermedad inflamatoria crónica	6, 74E-07	MCP1, CCR5, IL8RB, CYP3A4, IFNG, IL4, PGR, TNFRSF1B	
		Arthritis	arthritis inducida por proteoglicanos	2, 31E-06	IFNG, IL4
Respuesta inmune inflamatoria		Inflamación	inflammation of body region	1, 06E-11	MCP1, CCR5, IL8RB, CYP3A4, ESR1, ESR2, GSTP1, IFNG, IL4, NR112, PGR, TNFRSF1B
		respuesta mediada por	monocitos leucocitos	1, 62E-09 5, 70E-07	MCP1, CCR5, IFNG, IL4 MCP1, CCR5, IFNG, IL4, TNFRSF1B



células inmunes	linfocitos T citotóxicos	6,94E-07	IFNG, IL4
	fagocitos	7,00E-07	MCP1, CCR5, CLEC6A, IFNG, IL4
cantidad	neutrófilos	1,20E-10	MCP1, CCR5, IL8RB, ESR2, IFNG, IL4, TNFRSF1B
Acumulación	linfocitos T	3,17E-09	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG, IL4
	leucocitos	5,40E-08	MCP1, CCR5, IL8RB, IFNG, IL4, TNFRSF1B
morfología	macrófagos	1,29E-07	CCR5, IFNG, IL4, TNFRSF1B

© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

En esta tabla podemos observar, de derecha a izquierda, las moléculas asociadas, el P-valor de la asociación más fuerte que presentan, las células inmunes a las que afectan, las funciones específicas y generales de las moléculas nombradas. El programa Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) nos permite analizar la funcionalidad de las mencionadas moléculas y podemos descubrir que están fuertemente asociadas a numerosas funciones del sistema inmune muy relevantes en la patogénesis de la AR y en la cronificación de la respuesta inmune inflamatoria. Estos hallazgos apoyan nuestras hipótesis de implicación de los genes mencionados en la discusión en la AR y/o en la respuesta a su tratamiento.

# *CONCLUSIONES*

---





Las conclusiones de nuestro estudio fueron:

1. La presencia de polimorfismos en *Dectin-2*, *MCP-1*, *DC-SIGN*, *IL4*, *IL8RB* y *TNFRSF1B* determina el riesgo a desarrollar AR.
2. El efecto de los polimorfismos en *Dectina-2*, *MCP-1* y *DC-SIGN* sobre el riesgo a desarrollar AR es dependiente del género y podría explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en la incidencia de la enfermedad entre hombres y mujeres.
3. Polimorfismos en los genes *CYP3A4*, *SULT1A1* y *ESR2* que están implicados en el metabolismo y señalización de las hormonas esteroideas influyen sobre el riesgo a desarrollar AR. El efecto de *SULT1A1* y *ESR2* parece ser dependiente del género y, de nuevo, puede explicar las diferencias de incidencia de AR entre sexos.
4. La presencia de polimorfismos en *IFNG* y *TNFRSF1B* afectan al grado con que los pacientes de AR responden a la terapia con fármacos anti-TNF.
5. Polimorfismos en los genes *CYP1A1*, *CYP2C9*, *ESR2*, *GSTP1*, *NR1I2*, *SULT1A1* y *PGR* relacionados con el metabolismo y señalización de las hormonas esteroideas asocian con la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF y/o cambios en el valor absoluto del índice DAS28.
6. El uso de variantes genéticas en *CYP1B1*, *ESR2*, *GSTP1* y *NR1I2* permite mejorar significativamente la capacidad para predecir el grado con el que los pacientes de AR responden a la terapia con fármacos anti-TNF. Dichas variantes pueden, por tanto, tener utilidad clínica para el diseño de estrategias de tratamiento más individualizadas y adaptadas al riesgo de cada paciente.



# *BIBLIOGRAFÍA*

---

1. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A: **The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain.** *Rheumatology (Oxford)* 2002, **41**(1):88-95.
2. Loza E, Jover JA, Rodriguez L, Carmona L: **Multimorbidity: prevalence, effect on quality of life and daily functioning, and variation of this effect when one condition is a rheumatic disease.** *Semin Arthritis Rheum* 2009, **38**(4):312-319.
3. **Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española**
4. Sanmarti R, Ruiz-Esquide V, Hernandez MV: **Rheumatoid arthritis: a clinical overview of new diagnostic and treatment approaches.** *Curr Top Med Chem* 2013, **13**(6):698-704.
5. Silman AJ, Pearson JE: **Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res* 2002, **4 Suppl 3**:S265-272.
6. Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP: **Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature.** *Semin Arthritis Rheum* 2005, **34**(4):662-667.
7. MacGregor AJ, Riste LK, Hazes JM, Silman AJ: **Low prevalence of rheumatoid arthritis in black-Caribbeans compared with whites in inner city Manchester.** *Ann Rheum Dis* 1994, **53**(5):293-297.
8. Dowman B, Campbell RM, Zgaga L, Adeloye D, Chan KY: **Estimating the burden of rheumatoid arthritis in Africa: A systematic analysis.** *J Glob Health* 2012, **2**(2):020406.
9. Bradshaw D, Groenewald P, Laubscher R, Nannan N, Nojilana B, Norman R, Pieterse D, Schneider M, Bourne DE, Timaeus IM *et al*: **Initial burden of disease estimates for South Africa, 2000.** *S Afr Med J* 2003, **93**(9):682-688.
10. Iikuni N, Sato E, Hoshi M, Inoue E, Taniguchi A, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N, Yamanaka H: **The influence of sex on patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort.** *J Rheumatol* 2009, **36**(3):508-511.
11. Kvien TK, Uhlig T, Odegard S, Heiberg MS: **Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1069**:212-222.
12. Lahiri M, Luben RN, Morgan C, Bunn DK, Marshall T, Lunt M, Verstappen SM, Symmons DP, Khaw KT, Wareham N *et al*: **Using lifestyle factors to identify individuals at higher risk of inflammatory polyarthritis (results from the European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk and the Norfolk Arthritis Register--the EPIC-2-NOAR Study).** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(1):219-226.
13. Frisell T, Holmqvist M, Kallberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J: **Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age.** *Arthritis Rheum* 2013, **65**(11):2773-2782.
14. Karlson EW, Ding B, Keenan BT, Liao K, Costenbader KH, Klareskog L, Alfredsson L, Chibnik LB: **Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013, **65**(7):1147-1156.
15. Deane KD: **Can rheumatoid arthritis be prevented?** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2013, **27**(4):467-485.
16. Witkowski JM: **[Mechanisms of the immune system ageing and some age-associated diseases].** *Postepy Biochem* 2014, **60**(2):233-239.
17. Symmons DP: **Environmental factors and the outcome of rheumatoid arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003, **17**(5):717-727.
18. Molokhia M, McKeigue P: **Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture.** *Arthritis Res* 2000, **2**(2):115-125.
19. Callahan LF, Pincus T: **Formal education level as a significant marker of clinical status in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**(11):1346-1357.
20. McEntegart A, Morrison E, Capell HA, Duncan MR, Porter D, Madhok R, Thomson EA: **Effect of social deprivation on disease severity and outcome in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1997, **56**(7):410-413.
21. Maiden N, Capell HA, Madhok R, Hampson R, Thomson EA: **Does social disadvantage contribute to the excess mortality in rheumatoid arthritis patients?** *Ann Rheum Dis* 1999, **58**(9):525-529.
22. Joplin S, van der Zwan R, Joshua F, Wong PK: **Medication Adherence in Patients with Rheumatoid Arthritis: The Effect of Patient Education, Health Literacy, and Musculoskeletal Ultrasound.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:150658.



23. Olsson AR, Skogh T, Axelson O, Wingren G: **Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis.** *Occup Environ Med* 2004, **61**(3):233-238.
24. Oliver JE, Silman AJ: **Risk factors for the development of rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 2006, **35**(3):169-174.
25. Stolt P, Kallberg H, Lundberg I, Sjogren B, Klareskog L, Alfredsson L: **Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(4):582-586.
26. Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Kallberg H, Ronnelid J, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L: **Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(6):1072-1076.
27. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D: **Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis.** *Contraception* 1987, **35**(5):457-464.
28. Afridi HI, Kazi TG, Talpur FN, Naher S, Brabazon D: **Relationship between toxic metals exposure via cigarette smoking and rheumatoid arthritis.** *Clin Lab* 2014, **60**(10):1735-1745.
29. Gorman JD: **Smoking and rheumatoid arthritis: another reason to just say no.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(1):10-13.
30. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L: **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):835-841.
31. Kallberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Ronnelid J, Klareskog L, Alfredsson L: **Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(3):508-511.
32. Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW: **Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women.** *Am J Med* 2006, **119**(6):503 e501-509.
33. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L: **Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases.** *Curr Opin Rheumatol* 2007, **19**(1):49-54.
34. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L: **A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(10):3085-3092.
35. Klareskog L, Gregersen PK, Huizinga TW: **Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(12):2062-2066.
36. Linauskas A, de Thurah A, Andersen GN, Stengaard-Pedersen K: **[No evidence that diet has any influence on the aetiology of rheumatoid arthritis].** *Ugeskr Laeger* 2015, **177**(16).
37. Costenbader KH, Feskanich D, Holmes M, Karlson EW, Benito-Garcia E: **Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**(4):530-535.
38. Karlson EW, Deane K: **Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2012, **38**(2):405-426.
39. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG: **Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**(1):72-77.
40. Rosell M, Wesley AM, Rydin K, Klareskog L, Alfredsson L: **Dietary fish and fish oil and the risk of rheumatoid arthritis.** *Epidemiology* 2009, **20**(6):896-901.
41. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Sanchez-Fidalgo S, Aparicio-Soto M, Villegas I, Alarcon-de-la-Lastra C: **Dietary extra-virgin olive oil prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in murine collagen-induced arthritis.** *Eur J Nutr* 2015.
42. Silva S, Sepodes B, Rocha J, Direito R, Fernandes A, Brites D, Freitas M, Fernandes E, Bronze MR, Figueira ME: **Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis.** *J Nutr Biochem* 2015, **26**(4):360-368.
43. Tateishi N, Kaneda Y, Kakutani S, Kawashima H, Shibata H, Morita I: **Dietary supplementation with arachidonic acid increases arachidonic acid content in paw, but does not affect arthritis severity or prostaglandin E2 content in rat adjuvant-induced arthritis model.** *Lipids Health Dis* 2015, **14**(1):3.

44. Sundstrom B, Johansson I, Rantapaa-Dahlqvist S: **Diet and alcohol as risk factors for rheumatoid arthritis: a nested case-control study.** *Rheumatol Int* 2015, **35**(3):533-539.
45. Turk SA, van Beers-Tas MH, van Schaardenburg D: **Prediction of future rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 2014, **40**(4):753-770.
46. Lu B, Solomon DH, Costenbader KH, Karlson EW: **Alcohol consumption and risk of incident rheumatoid arthritis in women: a prospective study.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(8):1998-2005.
47. Lu B, Rho YH, Cui J, Iannaccone CK, Frits ML, Karlson EW, Shadick NA: **Associations of smoking and alcohol consumption with disease activity and functional status in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2014, **41**(1):24-30.
48. Jin Z, Xiang C, Cai Q, Wei X, He J: **Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis of prospective studies.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(11):1962-1967.
49. Wesley A, Bengtsson C, Elkan AC, Klareskog L, Alfredsson L, Wedren S: **Association between body mass index and anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis: results from a population-based case-control study.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013, **65**(1):107-112.
50. Crowson CS, Matteson EL, Davis JM, 3rd, Gabriel SE: **Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013, **65**(1):71-77.
51. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, Frisch M: **Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**(4):R133.
52. Lu B, Hiraki LT, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, Arkema EV, Costenbader KH, Karlson EW: **Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(11):1914-1922.
53. Rampton DS: **The influence of stress on the development and severity of immune-mediated diseases.** *J Rheumatol Suppl* 2011, **88**:43-47.
54. Nagano J, Sudo N, Nagaoka S, Yukioka M, Kondo M: **Life events, emotional responsiveness, and the functional prognosis of patients with rheumatoid arthritis.** *Biopsychosoc Med* 2015, **9**:15.
55. Hollan I, Dessein PH, Ronda N, Wasko MC, Svenungsson E, Agewall S, Cohen-Tervaert JW, Maki-Petaja K, Grundtvig M, Karpouzas GA *et al*: **Prevention of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2015.
56. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, Venables PJ: **Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis.** *Immunol Rev* 2010, **233**(1):34-54.
57. Cunningham MW: **Streptococcus and rheumatic fever.** *Curr Opin Rheumatol* 2012, **24**(4):408-416.
58. Guillemin L: **Infections in vasculitis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2013, **27**(1):19-31.
59. Dumond DC: **Part II: principal evidence associating rheumatic diseases with microbial infection.** *Infection and immunology in the rheumatic diseases, Beadsworth, London* 1976, **1976**:95-96.
60. Mathew AJ, Ravindran V: **Infections and arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014, **28**(6):935-959.
61. Salliot C, Bombardier C, Saraux A, Combe B, Dougados M: **Hormonal replacement therapy may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry HLA-DRB1 \*01 and/or \*04 alleles by protecting against the production of anti-CCP: results from the ESPOIR cohort.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(9):1683-1686.
62. Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman AJ: **Does rheumatoid arthritis remit during pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the United Kingdom performed prospectively from late pregnancy.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(6):1219-1227.
63. Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE: **The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study.** *J Rheumatol* 2004, **31**(2):207-213.
64. Rubtsova K, Marrack P, Rubtsov AV: **Sexual dimorphism in autoimmunity.** *J Clin Invest* 2015, **125**(6):2187-2193.

65. Ackerman LS: **Sex hormones and the genesis of autoimmunity.** *Arch Dermatol* 2006, **142**(3):371-376.
66. Libert C, Dejager L, Pinheiro I: **The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**(8):594-604.
67. Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas MM: **Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans.** *Am J Reprod Immunol* 2004, **52**(1):19-26.
68. Orozco G, Viatte S, Bowes J, Martin P, Wilson AG, Morgan AW, Steer S, Wordsworth P, Hocking LJ, Barton A *et al*: **Novel rheumatoid arthritis susceptibility locus at 22q12 identified in an extended UK genome-wide association study.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(1):24-30.
69. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N *et al*: **Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population.** *Nat Genet* 2012, **44**(5):511-516.
70. Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LG, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, Gabay C, Catrina AI, Cope AP, Cornelis F *et al*: **EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(5):638-641.
71. Klareskog L, Catrina AI, Paget S: **Rheumatoid arthritis.** *Lancet* 2009, **373**(9664):659-672.
72. Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Merlino L, Mudano AS, Burma M, Folsom AR, Saag KG: **Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(1):83-91.
73. Hazes JM, Dijkmans BA, Vandenbroucke JP, de Vries RR, Cats A: **Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption.** *Ann Rheum Dis* 1990, **49**(12):980-982.
74. Kisten Y, Gyori N, Af Klint E, Rezaei H, Levitsky A, Karlsson A, van Vollenhoven R: **Detection of clinically manifest and silent synovitis in the hands and wrists by fluorescence optical imaging.** *RMD Open* 2015, **1**(1):e000106.
75. Gent YY, Ter Wee MM, Voskuyl AE, den Uyl D, Ahmadi N, Dowling C, van Kuijk C, Hoekstra OS, Boers M, Lems WF *et al*: **Subclinical synovitis detected by macrophage PET, but not MRI, is related to short-term flare of clinical disease activity in early RA patients: an exploratory study.** *Arthritis Res Ther* 2015, **17**:266.
76. Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, Bresnihan B, Post WJ, t Hart BA, Breedveld FC, Tak PP: **Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(8):1481-1488.
77. Gent YY, Voskuyl AE, Kloet RW, van Schaardenburg D, Hoekstra OS, Dijkmans BA, Lammertsma AA, van der Laken CJ: **Macrophage positron emission tomography imaging as a biomarker for preclinical rheumatoid arthritis: findings of a prospective pilot study.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(1):62-66.
78. Nieuwenhuis WP, van Steenberg HW, Stomp W, Stijnen T, Huizinga TW, Bloem JL, van der Heijde D, Reijniere M, van der Helm-van Mil AH: **The course of bone marrow edema in early undifferentiated and rheumatoid arthritis; a longitudinal MRI study on bone level.** *Arthritis Rheumatol* 2015.
79. Leino M, Tuominen S, Pirila L, Tuominen R: **Effects of rheumatoid arthritis on household chores and leisure-time activities.** *Rheumatol Int* 2015.
80. Orozco G, Rueda B, Martin J: **Genetic basis of rheumatoid arthritis.** *Biomed Pharmacother* 2006, **60**(10):656-662.
81. Firestein GS: **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature* 2003, **423**(6937):356-361.
82. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etmnan M, Esdaile JM, Lacaille D: **Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies.** *Arthritis Rheum* 2008, **59**(12):1690-1697.
83. Warrington KJ, Kent PD, Frye RL, Lymp JF, Kopecky SL, Goronzy JJ, Weyand CM: **Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(5):R984-991.

84. Raza K, Buckley CE, Salmon M, Buckley CD: **Treating very early rheumatoid arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**(5):849-863.
85. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Dijkmans BA: **Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**(4):535-537.
86. Pinals RS, Masi AT, Larsen RA: **Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1981, **24**(10):1308-1315.
87. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS *et al*: **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**(3):315-324.
88. Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M, Smolen JS: **Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease.** *J Rheumatol* 2002, **29**(11):2278-2287.
89. Quinn MA, Green MJ, Marzo-Ortega H, Proudman S, Karim Z, Wakefield RJ, Conaghan PG, Emery P: **Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(11):3039-3045.
90. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD *et al*: **2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(9):2569-2581.
91. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD *et al*: **2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(9):1580-1588.
92. Kasturi S, Goldstein BL, Malspeis S, Karlson EW, Costenbader KH: **Comparison of the 1987 American College of Rheumatology and the 2010 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism criteria for classification of rheumatoid arthritis in the Nurses' Health Study cohorts.** *Rheumatol Int* 2014, **34**(3):407-411.
93. Radner H, Neogi T, Smolen JS, Aletaha D: **Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(1):114-123.
94. Burgers LE, van Nies JA, Ho LY, de Rooy DP, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH: **Long-term outcome of rheumatoid arthritis defined according to the 2010-classification criteria.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(2):428-432.
95. Tamai M, Kita J, Nakashima Y, Suzuki T, Horai Y, Okada A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K *et al*: **Combination of MRI-detected bone marrow oedema with 2010 rheumatoid arthritis classification criteria improves the diagnostic probability of early rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(12):2219-2220.
96. Rezaei H, Torp-Pedersen S, af Klint E, Backheden M, Kisten Y, Gyori N, van Vollenhoven RF: **Diagnostic utility of musculoskeletal ultrasound in patients with suspected arthritis--a probabilistic approach.** *Arthritis Res Ther* 2014, **16**(5):448.
97. **Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Artritis Reumatoide, GUIPCAR** [[http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Proyectos/GUIPCAR\\_2007/GUIPCAR\\_2011\\_V7\\_definitiva.pdf](http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Proyectos/GUIPCAR_2007/GUIPCAR_2011_V7_definitiva.pdf)]
98. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR: **Measurement of patient outcome in arthritis.** *Arthritis Rheum* 1980, **23**(2):137-145.
99. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A: **Spanish version of the Health Assessment Questionnaire: reliability, validity and transcultural equivalency.** Grupo para la Adaptacion del HAQ a la Poblacion Espanola. *J Rheumatol* 1993, **20**(12):2116-2122.
100. Pincus T, Summey JA, Soraci SA, Jr., Wallston KA, Hummon NP: **Assessment of patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire.** *Arthritis Rheum* 1983, **26**(11):1346-1353.
101. Pincus T, Yazici Y, Bergman M: **Saving time and improving care with a multidimensional health assessment questionnaire: 10 practical considerations.** *J Rheumatol* 2006, **33**(3):448-454.

102. Carr A: **Adult Measures of Quality of Life The Arthritis Impact Measurement Scales (AIMS/AIMS2), Disease Repercussion Profile (DRP), EuroQoL, Nottingham Health Profile (NHP), Patient Generated Index (PGI), Quality of Well-Being Scale (QWB), RAQoL, Short Form-36 (SF-36), Sickness Impact Profile (SIP), SIP-RA, and World Health Organization's Quality of Life Instruments (WHOQoL, WHOQoL-100, WHOQoL-Bref).** *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* 2003, **49(5S):S113–S133.**
103. Durmus D, Uzuner B, Durmaz Y, Bilgici A, Kuru O: **Michigan Hand Outcomes Questionnaire in rheumatoid arthritis patients: relationship with disease activity, quality of life, and handgrip strength.** *J Back Musculoskelet Rehabil* 2013, **26(4):467-473.**
104. Paulus HE, Ramos B, Wong WK, Ahmed A, Bulpitt K, Park G, Sterz M, Clements P: **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):2324-2331.**
105. Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ: **Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2006, **45(1):20-25.**
106. van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ: **Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2006, **6(1):37-41.**
107. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM: **How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46(2):357-365.**
108. van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB: **Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score.** *Ann Rheum Dis* 1990, **49(11):916-920.**
109. van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, Van de Putte L: **Disease activity score.** *Ann Rheum Dis* 1992, **51(1):140.**
110. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL: **Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria.** *Arthritis Rheum* 1996, **39(1):34-40.**
111. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL: **Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1995, **38(1):44-48.**
112. Aletaha D, Smolen J: **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):S100-108.**
113. Axelsen MB, Eshed I, Duer-Jensen A, Moller JM, Pedersen SJ, Ostergaard M: **Whole-body MRI assessment of disease activity and structural damage in rheumatoid arthritis: first step towards an MRI joint count.** *Rheumatology (Oxford)* 2014, **53(5):845-853.**
114. Schmidt WA: **Imaging: Whole-body MRI in RA: do we still need the rheumatologist?** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10(3):130-132.**
115. Sharp JT, Strand V, Leung H, Hurley F, Loew-Friedrich I: **Treatment with leflunomide slows radiographic progression of rheumatoid arthritis: results from three randomized controlled trials of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis.** *Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. Arthritis Rheum* 2000, **43(3):495-505.**
116. Bruynesteyn K, Landewe R, van der Linden S, van der Heijde D: **Radiography as primary outcome in rheumatoid arthritis: acceptable sample sizes for trials with 3 months' follow up.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63(11):1413-1418.**
117. Dohn UM, Ejbjerg BJ, Hasselquist M, Narvestad E, Moller J, Thomsen HS, Ostergaard M: **Detection of bone erosions in rheumatoid arthritis wrist joints with magnetic resonance imaging, computed tomography and radiography.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10(1):R25.**

118. Backhaus M, Kamradt T, Sandrock D, Loreck D, Fritz J, Wolf KJ, Raber H, Hamm B, Burmester GR, Bollow M: **Arthritis of the finger joints: a comprehensive approach comparing conventional radiography, scintigraphy, ultrasound, and contrast-enhanced magnetic resonance imaging.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(6):1232-1245.
119. Klarlund M, Ostergaard M, Jensen KE, Madsen JL, Skjodt H, Lorenzen I: **Magnetic resonance imaging, radiography, and scintigraphy of the finger joints: one year follow up of patients with early arthritis. The TIRA Group.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**(7):521-528.
120. Krohn M, Ohrndorf S, Werner SG, Schicke B, Burmester GR, Hamm B, Backhaus M, Hermann KG: **Near-infrared Fluorescence Optical Imaging in Early Rheumatoid Arthritis: A Comparison to Magnetic Resonance Imaging and Ultrasonography.** *J Rheumatol* 2015.
121. Nieuwenhuis WP, Krabben A, Stomp W, Huizinga TW, van der Heijde D, Bloem JL, van der Helm-van Mil AH, Reijniere M: **Evaluation of magnetic resonance imaging-detected tenosynovitis in the hand and wrist in early arthritis.** *Arthritis Rheumatol* 2015, **67**(4):869-876.
122. Bruynesteyn K, Wanders A, Landewe R, van der Heijde D: **How the type of risk reduction influences required sample sizes in randomised clinical trials.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**(11):1368-1371.
123. van der Heijde D: **Quantification of radiological damage in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004, **18**(6):847-860.
124. D'Agostino MA, Boers M, Kirwan J, van der Heijde D, Ostergaard M, Schett G, Landewe RB, Maksymowych WP, Naredo E, Dougados M *et al*: **Updating the OMERACT filter: implications for imaging and soluble biomarkers.** *J Rheumatol* 2014, **41**(5):1016-1024.
125. Nieuwenhuis WP, Reijniere M, van der Helm-van Mil AH: **Does adding the presence of MRI detected bone marrow oedema improve the accuracy of the 2010 EULAR/ACR criteria for rheumatoid arthritis?** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(3):e29.
126. Ji L, Li G, Xu Y, Zhou W, Zhang Z: **Early prediction of rheumatoid arthritis by magnetic resonance imaging in the absence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and radiographic erosions in undifferentiated inflammatory arthritis patients: a prospective study.** *Int J Rheum Dis* 2014.
127. Pedersen JK, Lorenzen T, Ejbjerg B, Szkudlarek M, Voss A, Ostergaard M, Svendsen AJ, Andersen LS, Horslev-Petersen K: **Low-field magnetic resonance imaging or combined ultrasonography and anti-cyclic citrullinated peptide antibody improve correct classification of individuals as established rheumatoid arthritis: results of a population-based, cross-sectional study.** *BMC Musculoskelet Disord* 2014, **15**:268.
128. Ariza R, Van Walsem A, Canal C, Roldan C, Betegon L, Oyaguez I, Janssen K: **[Cost-minimization analysis of subcutaneous abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis in Spain].** *Farm Hosp* 2014, **38**(4):257-265.
129. Hernandez C: **Uso de fármacos modificadores de la enfermedad en artritis reumatoide.** *Inf Ter Nac Salud* 2009; **33**: 99-109 2009.
130. SER (ed.): **Artritis reumatoide: Guía de la enfermedad para el paciente.**: Sociedad Española de Reumatología. Dr. F. Javier Ballina. .
131. Canete JD, Pablos JL: **Biologic therapy in rheumatoid arthritis.** *Curr Top Med Chem* 2013, **13**(6):752-759.
132. Prevoo ML, van Gestel AM, van THMA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL: **Remission in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. American Rheumatism Association preliminary remission criteria in relation to the disease activity score.** *Br J Rheumatol* 1996, **35**(11):1101-1105.
133. van Riel PL, van Gestel AM: **Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59** Suppl 1:i28-31.
134. Makinen H, Kautiainen H, Hannonen P, Sokka T: **Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis?** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(10):1410-1413.
135. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, Aletaha D, Allaart CF, Bathon J, Bombardieri S *et al*: **American College of Rheumatology/European League against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(3):404-413.
136. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, Aletaha D, Allaart CF, Bathon J, Bombardieri S *et al*: **American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism**

- provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(3):573-586.
137. Inanc N, Yilmaz-Oner S, Can M, Sokka T, Direskeneli H: **The role of depression, anxiety, fatigue, and fibromyalgia on the evaluation of the remission status in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2014, **41**(9):1755-1760.
138. Ohrndorf S, Werner SG, Finzel S, Backhaus M: **Musculoskeletal ultrasound and other imaging modalities in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2013, **25**(3):367-374.
139. Mohajerani P, Koch M, Thurmel K, Haller B, Rummeny EJ, Ntziachristos V, Meier R: **Fluorescence-aided tomographic imaging of synovitis in the human finger.** *Radiology* 2014, **272**(3):865-874.
140. Slooter MD, Bierau K, Chan AB, Lowik CW: **Near infrared fluorescence imaging for early detection, monitoring and improved intervention of diseases involving the joint.** *Connect Tissue Res* 2015, **56**(2):153-160.
141. Kisten Y GN, af Klint E, et al.: **Detection of clinically manifest and silent synovitis in the hands and wrists by fluorescence optical imaging.** *RMDOpen* 2015, **1**(e000106).
142. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Kvien TK, Navarro-Compan MV, Oliver S, Schoels M *et al*: **Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force.** *Ann Rheum Dis* 2015.
143. Lillegraven S, Prince FH, Shadick NA, Bykerk VP, Lu B, Frits ML, Iannaccone CK, Kvien TK, Haavardsholm EA, Weinblatt ME *et al*: **Remission and radiographic outcome in rheumatoid arthritis: application of the 2011 ACR/EULAR remission criteria in an observational cohort.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(5):681-686.
144. Ostergaard M, Moller-Bisgaard S: **Rheumatoid arthritis: Is imaging needed to define remission in rheumatoid arthritis?** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10**(6):326-328.
145. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR: **Macrophages in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res* 2000, **2**(3):189-202.
146. Kelderhouse LE, Robins MT, Rosenbalm KE, Hoylman EK, Mahalingam S, Low PS: **Prediction of Response to Therapy for Autoimmune/Inflammatory Diseases Using an Activated Macrophage-Targeted Radioimaging Agent.** *Mol Pharm* 2015.
147. Jain S, Tran TH, Amiji M: **Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis.** *Biomaterials* 2015, **61**:162-177.
148. Li J, Hsu HC, Mountz JD: **Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal.** *Curr Rheumatol Rep* 2012, **14**(5):445-454.
149. Chandrupatla DM, Weijers K, Gent YY, de Greeuw I, Lammertsma AA, Jansen G, van der Laken CJ, Molthoff CF: **Sustained macrophage infiltration upon multiple intra-articular injections: an improved rat model of rheumatoid arthritis for PET guided therapy evaluation.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:509295.
150. Zhu W, Li X, Fang S, Zhang X, Wang Y, Zhang T, Li Z, Xu Y, Qu S, Liu C *et al*: **Anti-Citrullinated Protein Antibodies Induce Macrophage Subset Disequilibrium in RA Patients.** *Inflammation* 2015.
151. Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C: **Macrophages in synovial inflammation.** *Front Immunol* 2011, **2**:52.
152. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, Boumans M, Lutter R, Tak PP, Baeten D: **Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(4):966-975.
153. Mottonen M, Isomaki P, Saario R, Toivanen P, Punnonen J, Lassila O: **Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**(11):1207-1214.
154. Laurent L, Anquetil F, Clavel C, Ndongo-Thiam N, Offer G, Miossec P, Pasquali JL, Sebbag M, Serre G: **IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies.** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(7):1425-1431.



155. Schinnerling K, Soto L, Garcia-Gonzalez P, Catalan D, Aguilon JC: **Skewing dendritic cell differentiation towards a tolerogenic state for recovery of tolerance in rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2015, **14**(6):517-527.
156. Shortman K, Naik SH: **Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(1):19-30.
157. Lebre MC, Tak PP: **Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis.** *Acta Reumatol Port* 2008, **33**(1):35-45.
158. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S: **Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation.** *Immunity* 2013, **38**(2):336-348.
159. Korb A, Pavenstadt H, Pap T: **Cell death in rheumatoid arthritis.** *Apoptosis* 2009, **14**(4):447-454.
160. Chen H, Pan J, Wang JD, Liao QM, Xia XR: **Suberoylanilide Hydroxamic Acid, an Inhibitor of Histone Deacetylase, Induces Apoptosis in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes.** *Inflammation* 2015.
161. Filer A: **The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Pharmacol* 2013, **13**(3):413-419.
162. Mellado M, Martinez-Munoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodriguez-Frade JM: **T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis.** *Front Immunol* 2015, **6**:384.
163. Carvalheiro H, da Silva JA, Souto-Carneiro MM: **Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 2013, **12**(3):401-409.
164. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N: **Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 2009, **76**(1):10-14.
165. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, Choi J, Kim S, Craft J, Mayer L, Cancrini C, Passerini L, Bacchetta R *et al*: **Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells.** *Blood* 2013, **121**(9):1595-1603.
166. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC: **Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.** *Science* 2003, **301**(5638):1374-1377.
167. Ahern DJ, Brennan FM: **The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators?** *Immunol Lett* 2011, **136**(2):115-121.
168. Jin HM, Kee SJ, Cho YN, Kang JH, Kim MJ, Jung HJ, Park KJ, Kim TJ, Lee SI, Choi H *et al*: **Dysregulated osteoclastogenesis is related to natural killer T cell dysfunction in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheumatol* 2015.
169. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ: **B cells are required for lupus nephritis in the polygenic, Fas-intact MRL model of systemic autoimmunity.** *J Immunol* 1999, **163**(7):3592-3596.
170. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD: **B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice.** *J Exp Med* 1996, **184**(5):2049-2053.
171. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T: **Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 2004, **350**(25):2572-2581.
172. Ng YS, Wardemann H, Chelnis J, Cunningham-Rundles C, Meffre E: **Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance.** *J Exp Med* 2004, **200**(7):927-934.
173. Herve M, Isnardi I, Ng YS, Bussel JB, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, Meffre E: **CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance.** *J Exp Med* 2007, **204**(7):1583-1593.
174. Isnardi I, Ng YS, Srdanovic I, Motaghedi R, Rudchenko S, von Bernuth H, Zhang SY, Puel A, Jouanguy E, Picard C *et al*: **IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans.** *Immunity* 2008, **29**(5):746-757.
175. Adlowitz DG, Barnard J, Bear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, Palanichamy A, Ezealaha E, Campbell D, Wei C *et al*: **Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response.** *PLoS One* 2015, **10**(6):e0128269.
176. van Venrooij WJ, van Beers JJ, Pruijn GJ: **Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1143**:268-285.

177. Mewar D, Wilson AG: **Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review.** *Biomed Pharmacother* 2006, **60**(10):648-655.
178. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A: **B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:681678.
179. Winchester R, Giles JT, Nativ S, Downer K, Zhang HZ, Bag-Ozbek A, Zartoshti A, Bokhari S, Bathon JM: **Association of Elevations of Specific T Cell And Monocyte Subpopulations in Rheumatoid Arthritis with Subclinical Coronary Artery Atherosclerosis.** *Arthritis Rheumatol* 2015.
180. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW: **The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10**(10):593-601.
181. de Siqueira MB, da Mota LM, Couto SC, Muniz-Junqueira MI: **Enhanced neutrophil phagocytic capacity in rheumatoid arthritis related to the autoantibodies rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptides.** *BMC Musculoskelet Disord* 2015, **16**:159.
182. Tang P, Chen Q, Lan Q, Chen Y, Yang H, An N, Xiao H, Liu H, Wu P, Xie T *et al*: **Role of basophils in rheumatoid arthritis (Review).** *Exp Ther Med* 2015, **9**(5):1567-1571.
183. Gerli R, Bistoni O, Russano A, Fiorucci S, Borgato L, Cesarotti ME, Lunardi C: **In vivo activated T cells in rheumatoid synovitis. Analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease.** *Clin Exp Immunol* 2002, **129**(3):549-555.
184. McInnes IB, Schett G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med* 2011, **365**(23):2205-2219.
185. Meusch U, Krasselt M, Rossol M, Baerwald C, Klingner M, Wagner U: **In vitro response pattern of monocytes after tmTNF reverse signaling predicts response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis.** *J Transl Med* 2015, **13**:256.
186. Lai NS, Yu HC, Yu CL, Koo M, Huang HB, Lu MC: **Anti-citrullinated protein antibodies suppress let-7a expression in monocytes from patients with rheumatoid arthritis and facilitate the inflammatory responses in rheumatoid arthritis.** *Immunobiology* 2015.
187. Sprangers S, de Vries TJ, Everts V: **Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells.** *J Immunol Res* 2016, **2016**:1475435.
188. Klimek E, Mikolajczyk T, Sulicka J, Kwasny-Krochin B, Korkosz M, Osmenda G, Wizner B, Surdacki A, Guzik T, Grodzicki TK *et al*: **Blood monocyte subsets and selected cardiovascular risk markers in rheumatoid arthritis of short duration in relation to disease activity.** *Biomed Res Int* 2014, **2014**:736853.
189. Ruscitti P, Cipriani P, Di Benedetto P, Liakouli V, Berardicurti O, Carubbi F, Ciccia F, Alvaro S, Triolo G, Giacomelli R: **Monocytes from patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes mellitus display an increased production of interleukin (IL)-1beta via the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family pyrin 3(NLRP3)-inflammasome activation: a possible implication for therapeutic decision in these patients.** *Clin Exp Immunol* 2015, **182**(1):35-44.
190. Durand M, Boire G, Komarova SV, Dixon SJ, Sims SM, Harrison RE, Nabavi N, Maria O, Manolson MF, Mizianty M *et al*: **The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study.** *Bone* 2011, **48**(3):588-596.
191. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?** *Nat Rev Rheumatol* 2012, **8**(4):235-243.
192. McInnes IB, Schett G: **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(6):429-442.
193. Kritas SK, Saggini A, Varvara G, Murmura G, Caraffa A, Antinolfi P, Toniato E, Pantalone A, Neri G, Frydas S *et al*: **Mast cell involvement in rheumatoid arthritis.** *J Biol Regul Homeost Agents* 2013, **27**(3):655-660.
194. Lee HP, Lin YY, Duh CY, Huang SY, Wang HM, Wu SF, Lin SC, Jean YH, Wen ZH: **Lemnalol attenuates mast cell activation and osteoclast activity in a gouty arthritis model.** *J Pharm Pharmacol* 2015, **67**(2):274-285.
195. Liang Y, Duan L, Xiong J, Zhu W, Liu Q, Wang D, Liu W, Li Z: **E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1beta-induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2016, **18**(1):105.

196. Scrivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G: **The immunology of rheumatoid arthritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1108**:312-322.
197. Fischer JA, Hueber AJ, Wilson S, Galm M, Baum W, Kitson C, Auer J, Lorenz SH, Moelleken J, Bader M *et al*: **Combined inhibition of tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 as a therapeutic opportunity in rheumatoid arthritis: development and characterization of a novel bispecific antibody.** *Arthritis Rheumatol* 2015, **67**(1):51-62.
198. Kunwar S, Dahal K, Sharma S: **Anti-IL-17 therapy in treatment of rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *Rheumatol Int* 2016, **36**(8):1065-1075.
199. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S: **Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Clin Chim Acta* 2016, **455**:161-171.
200. McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD: **Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape.** *Nat Rev Rheumatol* 2016, **12**(1):63-68.
201. Arend WP: **Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist.** *Semin Arthritis Rheum* 2001, **30**(5 Suppl 2):1-6.
202. Thompson C, Davies R, Choy E: **Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis.** *Cytokine* 2016, **86**:92-99.
203. Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant TT: **Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines.** *J Immunol* 1999, **163**(10):5383-5390.
204. Rose-John S: **IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6.** *Int J Biol Sci* 2012, **8**(9):1237-1247.
205. Burmester GR, Weinblatt ME, McInnes IB, Porter D, Barbarash O, Vatutin M, Szombati I, Esfandiari E, Sleeman MA, Kane CD *et al*: **Efficacy and safety of mavrilimumab in subjects with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(9):1445-1452.
206. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM: **Sex hormones and the immune response in humans.** *Hum Reprod Update* 2005, **11**(4):411-423.
207. Feher GK, Feher T, Zahumenszky Z: **Study on the inactivation mechanism of androgens in rheumatoid arthritis: excretory rate of free and conjugated 17-ketosteroids.** *Endokrinologie* 1979, **73**(2):167-172.
208. Kovats S: **Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways.** *Cell Immunol* 2015, **294**(2):63-69.
209. Dong G, Fan H, Yang Y, Zhao G, You M, Wang T, Hou Y: **17beta-Estradiol enhances the activation of IFN-alpha signaling in B cells by down-regulating the expression of let-7e-5p, miR-98-5p and miR-145a-5p that target IKKepsilon.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1852**(8):1585-1598.
210. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA: **Regulation of inflammasome signaling.** *Nat Immunol* 2012, **13**(4):333-342.
211. Trigunait A, Dimo J, Jorgensen TN: **Suppressive effects of androgens on the immune system.** *Cell Immunol* 2015, **294**(2):87-94.
212. Hughes GC: **Progesterone and autoimmune disease.** *Autoimmun Rev* 2012, **11**(6-7):A502-514.
213. Issop L, Rone MB, Papadopoulos V: **Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis.** *Mol Cell Endocrinol* 2013, **371**(1-2):34-46.
214. Hall PF: **Role of cytochromes P-450 in the biosynthesis of steroid hormones.** *Vitam Horm* 1985, **42**:315-368.
215. Simpson ER, Waterman MR: **Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH.** *Annu Rev Physiol* 1988, **50**:427-440.
216. Auchus ML, Auchus RJ: **Human steroid biosynthesis for the oncologist.** *J Investig Med* 2012, **60**(2):495-503.
217. Cutolo M, Sulli A, Straub RH: **Estrogen metabolism and autoimmunity.** *Autoimmun Rev* 2012, **11**(6-7):A460-464.
218. Capellino S, Straub RH, Cutolo M: **Aromatase and regulation of the estrogen-to-androgen ratio in synovial tissue inflammation: common pathway in both sexes.** *Ann N Y Acad Sci* 2014, **1317**:24-31.

219. Soldano S, Montagna P, Villaggio B, Parodi A, Gianotti G, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Cutolo M: **Endothelin and sex hormones modulate the fibronectin synthesis by cultured human skin scleroderma fibroblasts.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**(4):599-602.
220. Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, Pellegrini KL, On ST, Noel JK, Arredouani MS: **Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(27):9887-9892.
221. Tan JJ, Peeva E, Zandman-Goddard G: **Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens.** *Autoimmun Rev* 2015, **14**(6):536-542.
222. Morioka M, Shimodaira K, Kuwano Y, Fujikawa H, Saito H, Yanaihara T: **Effect of interleukin-1beta on aromatase activity and cell proliferation in human osteoblast-like cells (HOS).** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268**(1):60-64.
223. Mann M, Cortez V, Vadlamudi RK: **Epigenetics of estrogen receptor signaling: role in hormonal cancer progression and therapy.** *Cancers (Basel)* 2011, **3**(3):1691-1707.
224. Straub RH: **The complex role of estrogens in inflammation.** *Endocr Rev* 2007, **28**(5):521-574.
225. Sanchez-Aguilera A, Arranz L, Martin-Perez D, Garcia-Garcia A, Stavropoulou V, Kubovcakova L, Isern J, Martin-Salamanca S, Langa X, Skoda RC *et al*: **Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis.** *Cell Stem Cell* 2014, **15**(6):791-804.
226. Gonzalez DA, Diaz BB, Rodriguez Perez Mdel C, Hernandez AG, Chico BN, de Leon AC: **Sex hormones and autoimmunity.** *Immunol Lett* 2010, **133**(1):6-13.
227. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK: **The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells.** *Endocrinology* 2000, **141**(9):3403-3411.
228. Relloso M, Aragonese-Fenoll L, Lasarte S, Bourgeois C, Romera G, Kuchler K, Corbi AL, Munoz-Fernandez MA, Nombela C, Rodriguez-Fernandez JL *et al*: **Estradiol impairs the Th17 immune response against *Candida albicans*.** *J Leukoc Biol* 2012, **91**(1):159-165.
229. Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL: **Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses.** *PLoS Pathog* 2011, **7**(7):e1002149.
230. Matsuda KI, Yanagisawa M, Sano K, Ochiai I, Musatov S, Okoshi K, Tsukahara S, Ogawa S, Kawata M: **Visualisation and characterisation of oestrogen receptor alpha-positive neurons expressing green fluorescent protein under the control of the oestrogen receptor alpha promoter.** *Eur J Neurosci* 2013, **38**(2):2242-2249.
231. Schmidt M, Hartung R, Capellino S, Cutolo M, Pfeifer-Leeg A, Straub RH: **Estrone/17beta-estradiol conversion to, and tumor necrosis factor inhibition by, estrogen metabolites in synovial cells of patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(10):2913-2922.
232. Hughes GC, Choubey D: **Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone.** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10**(12):740-751.
233. Seillet C, Rouquie N, Foulon E, Douin-Echinard V, Krust A, Chambon P, Arnal JF, Guery JC, Laffont S: **Estradiol promotes functional responses in inflammatory and steady-state dendritic cells through differential requirement for activation function-1 of estrogen receptor alpha.** *J Immunol* 2013, **190**(11):5459-5470.
234. Carreras E, Turner S, Frank MB, Knowlton N, Osban J, Centola M, Park CG, Simmons A, Alberola-Ila J, Kovats S: **Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4.** *Blood* 2010, **115**(2):238-246.
235. Escribese MM, Kraus T, Rhee E, Fernandez-Sesma A, Lopez CB, Moran TM: **Estrogen inhibits dendritic cell maturation to RNA viruses.** *Blood* 2008, **112**(12):4574-4584.
236. Seillet C, Laffont S, Tremollieres F, Rouquie N, Ribot C, Arnal JF, Douin-Echinard V, Gourdy P, Guery JC: **The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor alpha signaling.** *Blood* 2012, **119**(2):454-464.

237. Andersson A, Stubelius A, Karlsson MN, Engdahl C, Erlandsson M, Grahne L, Lagerquist MK, Islander U: **Estrogen regulates T helper 17 phenotype and localization in experimental autoimmune arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2015, **17**:32.
238. Panchanathan R, Shen H, Bupp MG, Gould KA, Choubey D: **Female and male sex hormones differentially regulate expression of Ifi202, an interferon-inducible lupus susceptibility gene within the Nba2 interval.** *J Immunol* 2009, **183**(11):7031-7038.
239. Choubey D: **SP0019 Estrogens Effects on B Cells and Implications for Sex Bias in Development of Autoimmunity.** *Ann Rheum Dis* 2015;**74**:5-6 doi:10.1136/annrheumdis-2015-eular6599 2015.
240. Sakiani S, Olsen NJ, Kovacs WJ: **Gonadal steroids and humoral immunity.** *Nat Rev Endocrinol* 2013, **9**(1):56-62.
241. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM: **Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations.** *Immunol Lett* 2005, **97**(1):107-113.
242. Smith S, Ni Gabhann J, McCarthy E, Coffey B, Mahony R, Byrne JC, Stacey K, Ball E, Bell A, Cunnane G *et al*: **Estrogen receptor alpha regulates tripartite motif-containing protein 21 expression, contributing to dysregulated cytokine production in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(1):163-172.
243. Riggs BL: **The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption.** *J Clin Invest* 2000, **106**(10):1203-1204.
244. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P: **Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B.** *EMBO J* 1990, **9**(5):1603-1614.
245. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L: **NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis.** *J Immunol* 2008, **180**(8):5746-5753.
246. Miller L, Hunt JS: **Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone.** *J Immunol* 1998, **160**(10):5098-5104.
247. Hughes GC, Clark EA: **Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity.** *Autoimmunity* 2007, **40**(6):470-481.
248. Munoz-Cruz S, Togno-Pierce C, Morales-Montor J: **Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role.** *Curr Top Med Chem* 2011, **11**(13):1714-1727.
249. Hughes GC, Thomas S, Li C, Kaja MK, Clark EA: **Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells.** *J Immunol* 2008, **180**(4):2029-2033.
250. Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, Wen TF, Lindsay RJ, Orellana L, Mildvan D *et al*: **Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1.** *Nat Med* 2009, **15**(8):955-959.
251. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice LC: **Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone.** *J Endocrinol* 2008, **196**(1):67-77.
252. Pauklin S, Sernandez IV, Bachmann G, Ramiro AR, Petersen-Mahrt SK: **Estrogen directly activates AID transcription and function.** *J Exp Med* 2009, **206**(1):99-111.
253. Pauklin S, Petersen-Mahrt SK: **Progesterone inhibits activation-induced deaminase by binding to the promoter.** *J Immunol* 2009, **183**(2):1238-1244.
254. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S: **Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies.** *Springer Semin Immunopathol* 2006, **28**(2):175-184.
255. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ: **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(1):30-37.
256. Yarwood A, Huizinga TW, Worthington J: **The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA.** *Rheumatology (Oxford)* 2014.
257. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D *et al*: **Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid**

- arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005, **77**(6):1044-1060.
258. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, Read JE, Amjadi P, Green P, Syed K, Manka SW, Brennan FM, Gregory B *et al*: **Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(9):2344-2354.
259. Hou S, Gao GP, Zhang XJ, Sun L, Peng WJ, Wang HF, Ge XJ, Huang W, Sun YH: **PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis.** *Mod Rheumatol* 2013, **23**(1):50-60.
260. Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G: **An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**(10):599-608.
261. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, Balsa A, Blanco FJ, Canete JD, Caliz R, Carreno L, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B *et al*: **Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(2):R42.
262. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S *et al*: **Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.** *Nature* 2014, **506**(7488):376-381.
263. Stastny P: **Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis.** *J Clin Invest* 1976, **57**(5):1148-1157.
264. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S: **Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2013, **9**(3):141-153.
265. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: **The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1987, **30**(11):1205-1213.
266. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J *et al*: **Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis.** *Nat Genet* 2012, **44**(3):291-296.
267. Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, Symmons DP, Worthington J, Young A, Hyrich KL *et al*: **Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response.** *JAMA* 2015, **313**(16):1645-1656.
268. Menard L, Saadoun D, Isnardi I, Ng YS, Meyers G, Massad C, Price C, Abraham C, Motaghedhi R, Buckner JH *et al*: **The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans.** *J Clin Invest* 2011, **121**(9):3635-3644.
269. Romberg N, Chamberlain N, Saadoun D, Gentile M, Kinnunen T, Ng YS, Virdee M, Menard L, Cantaert T, Morbach H *et al*: **CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation.** *J Clin Invest* 2013, **123**(10):4283-4293.
270. Kim K, Bang SY, Lee HS, Cho SK, Choi CB, Sung YK, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Kang YM *et al*: **High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci.** *Ann Rheum Dis* 2014.
271. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, Zhernakova A, Stahl E, Viatte S, McAllister K *et al*: **High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis.** *Nat Genet* 2012, **44**(12):1336-1340.
272. Messemaker TC, Huizinga TW, Kurreeman F: **Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications.** *J Autoimmun* 2015.
273. Pers TH, Karjalainen JM, Chan Y, Westra HJ, Wood AR, Yang J, Lui JC, Vedantam S, Gustafsson S, Esko T *et al*: **Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions.** *Nat Commun* 2015, **6**:5890.
274. Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, Shores N, Whitton H, Ryan RJ, Shishkin AA *et al*: **Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants.** *Nature* 2015, **518**(7539):337-343.
275. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, Christiansen MW, Fairfax BP, Schramm K, Powell JE *et al*: **Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations.** *Nat Genet* 2013, **45**(10):1238-1243.

276. Trynka G, Sandor C, Han B, Xu H, Stranger BE, Liu XS, Raychaudhuri S: **Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants.** *Nat Genet* 2013, **45**(2):124-130.
277. Hu X, Kim H, Stahl E, Plenge R, Daly M, Raychaudhuri S: **Integrating autoimmune risk loci with gene-expression data identifies specific pathogenic immune cell subsets.** *Am J Hum Genet* 2011, **89**(4):496-506.
278. Aterido A, Palacio C, Marsal S, Avila G, Julia A: **Novel insights into the regulatory architecture of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis.** *PLoS One* 2014, **9**(6):e100690.
279. Naranbhai V, Fairfax BP, Makino S, Humburg P, Wong D, Ng E, Hill AV, Knight JC: **Genomic modulators of gene expression in human neutrophils.** *Nat Commun* 2015, **6**:7545.
280. Mathews RJ, Robinson JI, Battellino M, Wong C, Taylor JC, Eyre S, Churchman SM, Wilson AG, Isaacs JD, Hyrich K *et al*: **Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment.** *Ann Rheum Dis* 2014, **73**(6):1202-1210.
281. Lemire M, Zaidi SH, Ban M, Ge B, Aissi D, Germain M, Kassam I, Wang M, Zanke BW, Gagnon F *et al*: **Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci.** *Nat Commun* 2015, **6**:6326.
282. de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J: **New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope.** *FEBS Lett* 2011, **585**(23):3619-3626.
283. **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium.** *Nature* 1999, **401**(6756):921-923.
284. Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, Inoue I: **The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research.** *J Hum Genet* 2015.
285. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S: **Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis.** *J Hum Genet* 2015.
286. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, Ornetti P, Maillefert JF, Miossec P, Bonnotte B: **Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(8):2499-2503.
287. Plantinga TS, Fransen J, Takahashi N, Stienstra R, van Riel PL, van den Berg WB, Netea MG, Joosten LA: **Functional consequences of DECTIN-1 early stop codon polymorphism Y238X in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(1):R26.
288. Chen R, Luo J, Zhang D: **[Progress of molecular genetics research on rheumatoid arthritis].** *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2015, **32**(5):728-733.
289. Stanford SM, Bottini N: **PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene.** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10**(10):602-611.
290. Kirino Y, Remmers EF: **Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases.** *Nat Rev Rheumatol* 2015, **11**(7):401-414.
291. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zernakova A, Hinks A *et al*: **Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci.** *Nat Genet* 2010, **42**(6):508-514.
292. Krintel SB, Palermo G, Johansen JS, Germer S, Essioux L, Benayed R, Badi L, Ostergaard M, Hetland ML: **Investigation of single nucleotide polymorphisms and biological pathways associated with response to TNFalpha inhibitors in patients with rheumatoid arthritis.** *Pharmacogenet Genomics* 2012, **22**(8):577-589.
293. Toonen E: **Predicting response to anti-tumour necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients: what has genetics taught us so far? .** *OA Arthritis* 2013, **2013 Feb 02**;1(1):3.
294. Rooryck C, Barnette T, Richez C, Laleye A, Arveiler B, Schaeffer T: **Influence of FCGR3A-V212F and TNFRSF1B-M196R genotypes in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab therapy.** *Clin Exp Rheumatol* 2008, **26**(2):340-342.
295. Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z: **Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review.** *Clin Rev Allergy Immunol* 2013, **45**(2):170-179.
296. Liu C, Batliwalla F, Li W, Lee A, Roubenoff R, Beckman E, Khalili H, Damle A, Kern M, Furie R *et al*: **Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis.** *Mol Med* 2008, **14**(9-10):575-581.



297. Umicevic Mirkov M, Cui J, Vermeulen SH, Stahl EA, Toonen EJ, Makkinje RR, Lee AT, Huizinga TW, Allaart R, Barton A *et al*: **Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis**. *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(8):1375-1381.
298. Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K *et al*: **Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis**. *PLoS Genet* 2013, **9**(3):e1003394.
299. Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Barton A: **Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci**. *Arthritis Rheum* 2011, **63**(3):645-653.
300. Wallis SK, Cooney LA, Endres JL, Lee MJ, Ryu J, Somers EC, Fox DA: **A polymorphism in the interleukin-4 receptor affects the ability of interleukin-4 to regulate Th17 cells: a possible immunoregulatory mechanism for genetic control of the severity of rheumatoid arthritis**. *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(1):R15.
301. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, Wouters JM, Laman JD, Dolhain RJ: **Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study**. *BMC Med Genet* 2011, **12**:36.
302. Nunez C, Santiago JL, Varade J, de la Calle H, Figueredo MA, Fernandez-Gutierrez B, de la Concha EG, Urcelay E, Martinez A: **IL4 in the 5q31 context: association studies of type 1 diabetes and rheumatoid arthritis in the Spanish population**. *Immunogenetics* 2008, **60**(1):19-23.
303. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH: **Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis**. *Immunol Invest* 2013, **42**(6):455-469.
304. Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, Cheng R, Chen C, Lu J: **The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis**. *Cytokine* 2011, **56**(2):351-355.
305. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG: **Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis**. *Mol Biol Rep* 2012, **39**(1):81-87.
306. Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M: **The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis**. *Rheumatol Int* 2005, **26**(1):48-51.
307. Liu R, Xu N, Wang X, Shen L, Zhao G, Zhang H, Fan W: **Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis**. *Mol Biol Rep* 2012, **39**(6):6915-6922.
308. Fife MS, Fisher SA, John S, Worthington J, Shah CJ, Ollier WE, Panayi GS, Lewis CM, Lanchbury JS: **Multipoint linkage analysis of a candidate gene locus in rheumatoid arthritis demonstrates significant evidence of linkage and association with the corticotropin-releasing hormone genomic region**. *Arthritis Rheum* 2000, **43**(8):1673-1678.
309. Reyes-Castillo Z, Pereira-Suarez AL, Palafox-Sanchez CA, Rangel-Villalobos H, Estrada-Chavez C, Oregon-Romero E, Angel-Chavez LI, Munoz-Barrios S, Bueno-Topete MR, Munoz-Valle JF: **The extrapituitary prolactin promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and anti-CCP antibodies in Mexican population**. *Gene* 2013, **525**(1):130-135.
310. John S, Myerscough A, Eyre S, Roby P, Hajeer A, Silman AJ, Ollier WE, Worthington J: **Linkage of a marker in intron D of the estrogen synthase locus to rheumatoid arthritis**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**(8):1617-1620.
311. Song GG, Bae SC, Lee YH: **Vitamin D receptor FokI, BsmI, and TaqI polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis : A meta-analysis**. *Z Rheumatol* 2015.
312. Masi L, Maddali Bonghi S, Angotti C, Del Monte F, Carbonell Sala S, Basetti M, Amedei A, Falchetti A, Brandi ML: **The role of osteoprotegerin (OPG) and estrogen receptor (ER-alpha) gene polymorphisms in rheumatoid arthritis**. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2007, **4**(2):156-160.
313. Gonzalez-Canga A, Ugai K, Suzuki M, Okuzawa H, Negishi E, Ueno K: **Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with rheumatoid arthritis symptoms**. *Rheumatol Int* 2010, **30**(9):1259-1262.
314. Sato H, Ito A, Gonzalez-Canga A, Okuzawa H, Ugai K, Suzuki M, Namiki T, Ueno K: **Association of Rsa polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with rheumatoid arthritis**. *Rheumatol Int* 2012, **32**(7):2143-2148.

315. Stark K, Straub RH, Rovensky J, Blazickova S, Eiselt G, Schmidt M: **CYB5A polymorphism increases androgens and reduces risk of rheumatoid arthritis in women.** *Arthritis Res Ther* 2015, **17**:56.
316. Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yone CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR, Lipsky PE *et al*: **Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(5):1491-1500.
317. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, Montgomery DS, Walters K, Wilson AG: **Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(8):2549-2556.
318. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, Nelissen RG, Westendorp RG, Hoeben RC, Breedveld FC *et al*: **Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(7):1841-1848.
319. Vasilopoulos Y, Bagiatis V, Stamatopoulou D, Zisopoulos D, Alexiou I, Sarafidou T, Settas L, Sakkas L, Mamouris Z: **Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFR11 susceptibility variant with anti-TNF-alpha response in rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2011, **29**(4):701-704.
320. van der Helm-van Mil AH, le Cessie S, van Dongen H, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW: **A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(2):433-440.
321. Li W, Sasso EH, van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW: **Relationship of multi-biomarker disease activity score and other risk factors with radiographic progression in an observational study of patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2015.
322. van der Helm-van Mil AH: **Risk estimation in rheumatoid arthritis: from bench to bedside.** *Nat Rev Rheumatol* 2014, **10**(3):171-180.
323. Zhou QM, Zheng Y, Chibnik LB, Karlson EW, Cai T: **Assessing incremental value of biomarkers with multi-phase nested case-control studies.** *Biometrics* 2015.
324. Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar HJ: **A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(6):1765-1775.
325. Yarwood A, Han B, Raychaudhuri S, Bowes J, Lunt M, Pappas DA, Kremer J, Greenberg JD, Plenge R, Worthington J *et al*: **A weighted genetic risk score using all known susceptibility variants to estimate rheumatoid arthritis risk.** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(1):170-176.
326. Stephens M, Scheet P: **Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation.** *Am J Hum Genet* 2005, **76**(3):449-462.
327. Chen B, Wilkening S, Drechsel M, Hemminki K: **SNP\_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel.** *BMC Res Notes* 2009, **2**:214.
328. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V: **SNPStats: a web tool for the analysis of association studies.** *Bioinformatics* 2006, **22**(15):1928-1929.
329. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M *et al*: **The structure of haplotype blocks in the human genome.** *Science* 2002, **296**(5576):2225-2229.
330. Moore JH: **Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction.** *Expert Rev Mol Diagn* 2004, **4**(6):795-803.
331. Gaffen SL: **The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Curr Rheumatol Rep* 2009, **11**(5):365-370.
332. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, Skacic V, Badsha H, Peets T, Baranauskaitė A *et al*: **Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(1):R7.
333. Orozco G, Ioannidis JP, Morris A, Zeggini E: **Sex-specific differences in effect size estimates at established complex trait loci.** *Int J Epidemiol* 2012, **41**(5):1376-1382.
334. Hussein YM, Mohamed RH, Pasha HF, El-Shahawy EE, Alzahrani SS: **Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients.** *Cell Immunol* 2011, **271**(1):192-196.

335. Hussein YM, El Tarhouny SA, Mohamed RH, El-Shal AS, Abul-Saoud AM, Abdo M: **Association of CD4 enhancer gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients.** *Rheumatol Int* 2012, **32**(8):2325-2330.
336. Hussein Y, El-Tarhouny S, Mohamed R, Pasha H, Abul-Saoud A: **Association of interleukin-4 receptor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients.** *Joint Bone Spine* 2012, **79**(1):38-42.
337. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Gonzalez-Alvaro I, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR, de la Serna AR, Caliz R, Blanco FJ, Pascual-Salcedo D *et al*: **Lack of association with rheumatoid arthritis of selected polymorphisms in 4 candidate genes: CFH, CD209, eotaxin-3, and MHC2TA.** *J Rheumatol* 2009, **36**(8):1590-1595.
338. Gutierrez L, Nikolic T, van Dijk TB, Hammad H, Vos N, Willart M, Grosveld F, Philipsen S, Lambrecht BN: **Gata1 regulates dendritic-cell development and survival.** *Blood* 2007, **110**(6):1933-1941.
339. Taylor PR, Reid DM, Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S, Wong SY: **Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo.** *Eur J Immunol* 2005, **35**(7):2163-2174.
340. Aragane Y, Maeda A, Schwarz A, Tezuka T, Ariizumi K, Schwarz T: **Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance.** *J Immunol* 2003, **171**(7):3801-3807.
341. Carter RW, Thompson C, Reid DM, Wong SY, Tough DF: **Induction of CD8+ T cell responses through targeting of antigen to Dectin-2.** *Cell Immunol* 2006, **239**(2):87-91.
342. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD *et al*: **Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection.** *J Exp Med* 2009, **206**(9):2037-2051.
343. Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD, Jr., Ariizumi K: **Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses.** *J Biol Chem* 2006, **281**(50):38854-38866.
344. Gringhuis SI, Wevers BA, Kaptein TM, van Capel TM, Theelen B, Boekhout T, de Jong EC, Geijtenbeek TB: **Selective C-Rel activation via Malt1 controls anti-fungal T(H)-17 immunity by dectin-1 and dectin-2.** *PLoS Pathog* 2011, **7**(1):e1001259.
345. Daly C, Rollins BJ: **Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies.** *Microcirculation* 2003, **10**(3-4):247-257.
346. Rollins BJ: **Chemokines.** *Blood* 1997, **90**(3):909-928.
347. Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K: **Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**(6):762-771.
348. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S *et al*: **Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells.** *Blood* 2010, **115**(2):335-343.
349. Scaife S, Brown R, Kellie S, Filer A, Martin S, Thomas AM, Bradfield PF, Amft N, Salmon M, Buckley CD: **Detection of differentially expressed genes in synovial fibroblasts by restriction fragment differential display.** *Rheumatology (Oxford)* 2004, **43**(11):1346-1352.
350. Gochuico BR, Avila NA, Chow CK, Novero LJ, Wu HP, Ren P, MacDonald SD, Travis WD, Stylianou MP, Rosas IO: **Progressive preclinical interstitial lung disease in rheumatoid arthritis.** *Arch Intern Med* 2008, **168**(2):159-166.
351. Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, Valenzuela A, Nunez-Roldan A: **MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis.** *Hum Immunol* 2003, **64**(7):741-744.
352. Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG: **Functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 and rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 2003, **32**(4):235-239.
353. Rovin BH, Lu L, Saxena R: **A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **259**(2):344-348.

354. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ *et al*: **CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study.** *Circulation* 2005, **112**(8):1113-1120.
355. Hwang SY, Cho ML, Park B, Kim JY, Kim YH, Min DJ, Min JK, Kim HY: **Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Korean population and in Korean patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease.** *Eur J Immunogenet* 2002, **29**(5):413-416.
356. Hussein YM, El-Shal AS, Rezk NA, Abdel Galil SM, Alzahrani SS: **Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population.** *Cytokine* 2013, **61**(3):849-855.
357. Burgos PI, Causey ZL, Tamhane A, Kelley JM, Brown EE, Hughes LB, Danila MI, van Everdingen A, Conn DL, Jonas BL *et al*: **Association of IL4R single-nucleotide polymorphisms with rheumatoid nodules in African Americans with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(3):R75.
358. Jiang L, Yin J, Ye L, Yang J, Hemani G, Liu AJ, Zou H, He D, Sun L, Zeng X *et al*: **Novel risk loci for rheumatoid arthritis in Han Chinese and congruence with risk variants in Europeans.** *Arthritis Rheumatol* 2014, **66**(5):1121-1132.
359. Kim K, Bang SY, Lee HS, Cho SK, Choi CB, Sung YK, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Kang YM *et al*: **High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci.** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(3):e13.
360. Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB: **Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res* 1999, **1**(1):81-91.
361. Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM: **Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8.** *J Immunol* 1991, **147**(7):2187-2195.
362. Verburgh CA, Hart MH, Aarden LA, Swaak AJ: **Interleukin-8 (IL-8) in synovial fluid of rheumatoid and nonrheumatoid joint effusions.** *Clin Rheumatol* 1993, **12**(4):494-499.
363. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY: **IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**(2):R120-128.
364. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G: **Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis.** *J Exp Med* 1998, **187**(4):461-468.
365. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T: **Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes.** *Blood* 1997, **90**(7):2804-2809.
366. Lubberts E, Joosten LA, van Den Bersselaar L, Helsen MM, Bakker AC, van Meurs JB, Graham FL, Richards CD, van Den Berg WB: **Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction.** *J Immunol* 1999, **163**(8):4546-4556.
367. Deleuran B, Iversen L, Kristensen M, Field M, Kragballe K, Thestrup-Pedersen K, Stengaard-Pedersen K: **Interleukin-8 secretion and 15-lipoxygenase activity in rheumatoid arthritis: in vitro anti-inflammatory effects by interleukin-4 and interleukin-10, but not by interleukin-1 receptor antagonist protein.** *Br J Rheumatol* 1994, **33**(6):520-525.
368. Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J: **Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(1):61-65.
369. Dahlqvist SR, Arlestig L, Sikstrom C, Linghult S: **Tumor necrosis factor receptor type II (exon 6) and interleukin-6 (-174) gene polymorphisms are not associated with family history but tumor necrosis factor receptor type II is associated with hypertension in patients with rheumatoid arthritis from northern Sweden.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(11):3096-3098.
370. Ghelani AM, Samanta A, Jones AC, Mastana SS: **Association analysis of TNFR2, VDR, A2M, GSTT1, GSTM1, and ACE genes with rheumatoid arthritis in South Asians and Caucasians of East Midlands in the United Kingdom.** *Rheumatol Int* 2011, **31**(10):1355-1361.

371. Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, Matthey DL: **Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(6):R1227-1234.
372. Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G: **Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2002, **29**(9):1847-1850.
373. Bayley JP, Bakker AM, Kaijzel EL, Huizinga TW, Verweij CL: **Association of polymorphisms of the tumour necrosis factor receptors I and II and rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**(8):969-971.
374. Marinou I, Till SH, Moore DJ, Wilson AG: **Lack of association or interactions between the IL-4, IL-4Ralpha and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**(4):R80.
375. Jiang Y, Zhang R, Zheng J, Liu P, Tang G, Lv H, Zhang L, Shang Z, Zhan Y, Lv W *et al*: **Meta-analysis of 125 rheumatoid arthritis-related single nucleotide polymorphisms studied in the past two decades.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e51571.
376. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazieres B: **Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(6):1093-1100.
377. Maeda A, Matsushita K, Yamazaki F, Kawada A, Tezuka T, Aragane Y: **Terfenadine antagonism against interleukin-4-modulated gene expression of T cell cytokines.** *J Invest Dermatol* 2003, **121**(3):490-495.
378. Rico MC, Manns JM, Driban JB, Uknis AB, Kunapuli SP, Dela Cadena RA: **Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta are pro-inflammatory molecules in rheumatoid arthritis.** *Transl Res* 2008, **152**(2):95-98.
379. Kidd P: **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.** *Altern Med Rev* 2003, **8**(3):223-246.
380. Schwarz EM, Salgame P, Bloom BR: **Molecular regulation of human interleukin 2 and T-cell function by interleukin 4.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(16):7734-7738.
381. Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolich J, Li Y, Rehaume L, Hancock RE: **Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways.** *J Immunol* 2007, **179**(11):7684-7691.
382. Nencioni A, Beck J, Werth D, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P: **Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(13):3933-3941.
383. Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN: **Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(15):8886-8891.
384. Manna SK, Aggarwal BB: **Interleukin-4 down-regulates both forms of tumor necrosis factor receptor and receptor-mediated apoptosis, NF-kappaB, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase. Comparison with interleukin-13.** *J Biol Chem* 1998, **273**(50):33333-33341.
385. Fujikado N, Saijo S, Iwakura Y: **Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**(4):R100.
386. Auer J, Blass M, Schulze-Koops H, Russwurm S, Nagel T, Kalden JR, Rollinghoff M, Beuscher HU: **Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**(5):R94.
387. Nissinen R, Leirisalo-Repo M, Nieminen AM, Halme L, Farkkila M, Palosuo T, Vaarala O: **Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**(10):1327-1330.
388. Chamary JV, Parmley JL, Hurst LD: **Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals.** *Nat Rev Genet* 2006, **7**(2):98-108.

389. Czech A, Fedyunin I, Zhang G, Ignatova Z: **Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations.** *Mol Biosyst* 2010, **6**(10):1767-1772.
390. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C: **Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?** *Methods Mol Biol* 2009, **578**:23-39.
391. Gu W, Zhou T, Wilke CO: **A universal trend of reduced mRNA stability near the translation-initiation site in prokaryotes and eukaryotes.** *PLoS Comput Biol* 2010, **6**(2):e1000664.
392. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L: **Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure.** *Science* 2006, **314**(5807):1930-1933.
393. Komar AA, Lesnik T, Reiss C: **Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation.** *FEBS Lett* 1999, **462**(3):387-391.
394. Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R: **Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima.** *J Mol Biol* 2008, **383**(2):281-291.
395. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM: **A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity.** *Science* 2007, **315**(5811):525-528.
396. Shaw MA, Clayton D, Atkinson SE, Williams H, Miller N, Sibthorpe D, Blackwell JM: **Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35.** *J Med Genet* 1996, **33**(8):672-677.
397. Puga I, Lainez B, Fernandez-Real JM, Buxade M, Broch M, Vendrell J, Espel E: **A polymorphism in the 3' untranslated region of the gene for tumor necrosis factor receptor 2 modulates reporter gene expression.** *Endocrinology* 2005, **146**(5):2210-2220.
398. Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY: **In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Acad Med Singapore* 2007, **36**(2):96-99.
399. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE: **TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells.** *Blood* 2006, **108**(1):253-261.
400. Lainez B, Fernandez-Real JM, Romero X, Esplugues E, Canete JD, Ricart W, Engel P: **Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2.** *Int Immunol* 2004, **16**(1):169-177.
401. Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Satomi M *et al*: **Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively.** *Immunogenetics* 2002, **53**(12):1020-1027.
402. Arlestig L, Wallberg Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S: **Polymorphism of genes related to cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2007, **25**(6):866-871.
403. Potter C, Worthington J, Silman A, Barton A: **TNFR2 is not associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Caucasian population.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(8):2579-2581.
404. Liu HB, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB, Voskuhl RR: **Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease.** *J Immunol* 2003, **171**(12):6936-6940.
405. Polanczyk M, Yellayi S, Zamora A, Subramanian S, Tovey M, Vandenbark AA, Offner H, Zachary JF, Fillmore PD, Blankenhorn EP *et al*: **Estrogen receptor-1 (Esr1) and -2 (Esr2) regulate the severity of clinical experimental allergic encephalomyelitis in male mice.** *Am J Pathol* 2004, **164**(6):1915-1924.
406. Othman EE, Salama S, Ismail N, Al-Hendy A: **Toward gene therapy of endometriosis: adenovirus-mediated delivery of dominant negative estrogen receptor genes inhibits cell proliferation, reduces cytokine production, and induces apoptosis of endometriotic cells.** *Fertil Steril* 2007, **88**(2):462-471.
407. Cvorovic A, Yuan C, Paruthiyil S, Miller OH, Yamamoto KR, Leitman DC: **Cross talk between glucocorticoid and estrogen receptors occurs at a subset of proinflammatory genes.** *J Immunol* 2011, **186**(7):4354-4360.
408. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF: **A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(24):9063-9068.

409. Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M: **Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta.** *Cancer Res* 2002, **62**(17):4977-4984.
410. Thummel KE, Wilkinson GR: **In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998, **38**:389-430.
411. Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA *et al*: **Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**(5):447-458.
412. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ: **CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity.** *Clin Pharmacol Ther* 2000, **67**(1):48-56.
413. Niwa T, Yabusaki Y, Honma K, Matsuo N, Tatsuta K, Ishibashi F, Katagiri M: **Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones.** *Xenobiotica* 1998, **28**(6):539-547.
414. Lamba V, Panetta JC, Strom S, Schuetz EG: **Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression.** *J Pharmacol Exp Ther* 2010, **332**(3):1088-1099.
415. Kadlubar FF, Berkowitz GS, DeLongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, Lamba J, Schuetz E, Wolff MS: **The CYP3A4\*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**(4):327-331.
416. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB: **Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4.** *J Natl Cancer Inst* 1998, **90**(16):1225-1229.
417. Ando Y, Tateishi T, Sekido Y, Yamamoto T, Satoh T, Hasegawa Y, Kobayashi S, Katsumata Y, Shimokata K, Saito H: **Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(18):1587-1590.
418. Zhai G, Teumer A, Stolk L, Perry JR, Vandenput L, Coviello AD, Koster A, Bell JT, Bhasin S, Eriksson J *et al*: **Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms.** *PLoS Genet* 2011, **7**(4):e1002025.
419. Villarino AV, Huang E, Hunter CA: **Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27.** *J Immunol* 2004, **173**(2):715-720.
420. Wang ZM, Liu C, Dziarski R: **Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by Staphylococcus aureus, peptidoglycan, and endotoxin.** *J Biol Chem* 2000, **275**(27):20260-20267.
421. Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Jr., Libby P: **Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor.** *J Biol Chem* 2002, **277**(46):44147-44154.
422. Sundstrom JB, McMullan LK, Spiropoulou CF, Hooper WC, Ansari AA, Peters CJ, Rollin PE: **Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells.** *J Virol* 2001, **75**(13):6070-6085.
423. Yoshimura T, Takahashi M: **IFN-gamma-mediated survival enables human neutrophils to produce MCP-1/CCL2 in response to activation by TLR ligands.** *J Immunol* 2007, **179**(3):1942-1949.
424. Bosco MC, Puppo M, Pastorino S, Mi Z, Melillo G, Massazza S, Rapisarda A, Varesio L: **Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production by macrophages.** *J Immunol* 2004, **172**(3):1681-1690.
425. **Regulation of the Immune System in Response to the Treatment With Tocilizumab in Rheumatoid Arthritis Patients.** In. Edited by Fundació Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau RPA, clinicaltrials.gov edn: clinicaltrials.gov: June 28, 2012.
426. Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, Turino SY, Brodersen JB, Rashid S, Rasmussen BK *et al*: **Associations between functional polymorphisms in the NFkappaB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease.** *Pharmacogenomics J* 2014, **14**(6):526-534.
427. Chen DY, Lan JL, Lin FJ, Hsieh TY, Wen MC: **Predominance of Th1 cytokine in peripheral blood and pathological tissues of patients with active untreated adult onset Still's disease.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**(10):1300-1306.



428. Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke GW, 3rd, Tzakis AG, Ricordi C, Miller J, Esquenzai V: **Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow.** *Hum Immunol* 2004, **65**(2):93-103.
429. Alonso MN, Wong MT, Zhang AL, Winer D, Suhoski MM, Tolentino LL, Gaitan J, Davidson MG, Kung TH, Galel DM *et al*: **T(H)1, T(H)2, and T(H)17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets.** *Blood* 2011, **118**(12):3311-3320.
430. Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, Rodriguez-Fernandez JL, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Munoz-Fernandez MA, Sanchez-Mateos P, Corbi AL: **DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents.** *J Immunol* 2002, **168**(6):2634-2643.
431. Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ: **Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes.** *Blood* 1999, **93**(4):1137-1144.
432. Pascual-Garcia M, Rue L, Leon T, Julve J, Carbo JM, Matalonga J, Auer H, Celada A, Escola-Gil JC, Steffensen KR *et al*: **Reciprocal negative cross-talk between liver X receptors (LXRs) and STAT1: effects on IFN-gamma-induced inflammatory responses and LXR-dependent gene expression.** *J Immunol* 2013, **190**(12):6520-6532.
433. Vrzal R, Ulrichova J, Dvorak Z: **Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2004, **148**(1):3-10.
434. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP: **Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes.** *Blood* 1997, **90**(10):4162-4171.
435. Sanders VM: **Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development.** *Brain Behav Immun* 2006, **20**(4):317-324.
436. Bowes JD, Potter C, Gibbons LJ, Hyrich K, Plant D, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, Worthington J, Barton A: **Investigation of genetic variants within candidate genes of the TNFRSF1B signalling pathway on the response to anti-TNF agents in a UK cohort of rheumatoid arthritis patients.** *Pharmacogenet Genomics* 2009, **19**(4):319-323.
437. Ongaro A, De Mattei M, Pellati A, Caruso A, Ferretti S, Masieri FF, Fotinidi M, Farina I, Trotta F, Padovan M: **Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T>G polymorphism predict the response grading to anti-TNFalpha therapy in rheumatoid arthritis?** *Rheumatol Int* 2008, **28**(9):901-908.
438. Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C, Tamouza R, Loiseau P, Ravaud P, Kupper H, Becquemont L, Charron D, Mariette X: **A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**(4):478-484.
439. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, Morgan AW, Wilson AG: **Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis.** *Hum Mol Genet* 2008, **17**(22):3532-3538.
440. Toonen EJ, Coenen MJ, Kievit W, Fransen J, Eijsbouts AM, Scheffer H, Radstake TR, Creemers MC, de Rooij DJ, van Riel PL *et al*: **The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T>G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**(8):1174-1177.
441. Kanda N, Watanabe S: **17Beta-estradiol inhibits MCP-1 production in human keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2003, **120**(6):1058-1066.
442. Re A, Aiello A, Nanni S, Grasselli A, Benvenuti V, Pantisano V, Strigari L, Colussi C, Ciccone S, Mazzetti AP *et al*: **Silencing of GSTP1, a prostate cancer prognostic gene, by the estrogen receptor-beta and endothelial nitric oxide synthase complex.** *Mol Endocrinol* 2011, **25**(12):2003-2016.
443. De Amicis F, Zupo S, Panno ML, Malivindi R, Giordano F, Barone I, Mauro L, Fuqua SA, Ando S: **Progesterone receptor B recruits a repressor complex to a half-PRE site of the estrogen receptor alpha gene promoter.** *Mol Endocrinol* 2009, **23**(4):454-465.
444. Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Emberts CG, McConda DB, Barry PN, Magnusen JE: **Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription.** *Mol Cell Endocrinol* 2010, **323**(2):268-276.

445. Giulianelli S, Vaque JP, Soldati R, Wargon V, Vanzulli SI, Martins R, Zeitlin E, Molinolo AA, Helguero LA, Lamb CA *et al*: **Estrogen receptor alpha mediates progesterin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters.** *Cancer Res* 2012, **72**(9):2416-2427.
446. Treeck O, Juhasz-Boess I, Lattrich C, Horn F, Goerse R, Ortman O: **Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **110**(3):507-520.
447. Notas G, Kampa M, Pelekanou V, Troullinaki M, Jacquot Y, Leclercq G, Castanas E: **Whole transcriptome analysis of the ERalpha synthetic fragment P295-T311 (ERalpha17p) identifies specific ERalpha-isoform (ERalpha, ERalpha36)-dependent and -independent actions in breast cancer cells.** *Mol Oncol* 2013, **7**(3):595-610.
448. Huderson BP, Duplessis TT, Williams CC, Seger HC, Marsden CG, Pouey KJ, Hill SM, Rowan BG: **Stable inhibition of specific estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylation confers increased growth, migration/invasion, and disruption of estradiol signaling in MCF-7 breast cancer cells.** *Endocrinology* 2012, **153**(9):4144-4159.
449. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A: **Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway.** *Cancer Res* 2009, **69**(14):5793-5800.
450. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A: **Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals.** *Oncogene* 2013, **32**(1):117-126.
451. Zhou C, Poulton EJ, Grun F, Bammler TK, Blumberg B, Thummel KE, Eaton DL: **The dietary isothiocyanate sulforaphane is an antagonist of the human steroid and xenobiotic nuclear receptor.** *Mol Pharmacol* 2007, **71**(1):220-229.
452. Rosenfeld JM, Vargas R, Jr., Xie W, Evans RM: **Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(7):1268-1282.
453. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD: **Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements.** *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**(21):3613-3634.
454. Pichon X, Wilson LA, Stoneley M, Bastide A, King HA, Somers J, Willis AE: **RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation.** *Curr Protein Pept Sci* 2012, **13**(4):294-304.
455. Lappalainen T, Sammeth M, Friedlander MR, t Hoen PA, Monlong J, Rivas MA, Gonzalez-Porta M, Kurbatova N, Griebel T, Ferreira PG *et al*: **Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans.** *Nature* 2013, **501**(7468):506-511.
456. Theodorou V, Stark R, Menon S, Carroll JS: **GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility.** *Genome Res* 2013, **23**(1):12-22.
457. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, Brown GD, Gojis O, Ellis IO, Green AR *et al*: **Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer.** *Nature* 2012, **481**(7381):389-393.
458. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, Carabbio C, Felli L, Miceli D, Farruggio R *et al*: **Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996, **81**(2):820-827.
459. Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J: **Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(5):2309-2314.
460. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Bagnasco M, Coviello DA, Carruba G, lo Casto M, Castagnetta L: **Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ T lymphocytes in normal and rheumatoid synovium.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**(8):1087-1097.
461. Jiang Y, Gong P, Madak-Erdogan Z, Martin T, Jeyakumar M, Carlson K, Khan I, Smillie TJ, Chittiboyina AG, Rotte SC *et al*: **Mechanisms enforcing the estrogen receptor beta selectivity of botanical estrogens.** *FASEB J* 2013, **27**(11):4406-4418.
462. Recker RR, Davies KM, Dowd RM, Heaney RP: **The effect of low-dose continuous estrogen and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in elderly women. A randomized, controlled trial.** *Ann Intern Med* 1999, **130**(11):897-904.

463. Turner RT: **Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis.** *J Bone Miner Res* 1999, **14**(2):187-191.
464. Ostensen M: **Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **876**:131-143; discussion 144.
465. Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, De Keyser F, Van der Straeten C, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM: **Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition.** *J Rheumatol* 1990, **17**(12):1620-1622.
466. Merlino LA, Cerhan JR, Criswell LA, Mikuls TR, Saag KG: **Estrogen and other female reproductive risk factors are not strongly associated with the development of rheumatoid arthritis in elderly women.** *Semin Arthritis Rheum* 2003, **33**(2):72-82.
467. Wilder RL: **Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol Suppl* 1996, **44**:10-12.
468. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL: **Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2001, **28**(8):1809-1816.
469. Erlandsson MC, Ohlsson C, Gustafsson JA, Carlsten H: **Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus.** *Immunology* 2001, **103**(1):17-25.
470. Mo R, Chen J, Grolleau-Julius A, Murphy HS, Richardson BC, Yung RL: **Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes.** *J Immunol* 2005, **174**(10):6023-6029.
471. Da Silva JA: **Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **876**:102-117; discussion 117-108.
472. Medina KL, Strasser A, Kincade PW: **Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors.** *Blood* 2000, **95**(6):2059-2067.
473. Beagley KW, Gockel CM: **Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, **38**(1):13-22.
474. Laffont S, Rouquie N, Azar P, Seillet C, Plumas J, Asporid C, Guery JC: **X-Chromosome complement and estrogen receptor signaling independently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells from women.** *J Immunol* 2014, **193**(11):5444-5452.
475. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C *et al*: **The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**(7):555-572.
476. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J: **Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins.** *J Biol Chem* 1997, **272**(15):10004-10012.
477. Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, Canete JD, Maymo J, Ballina J, Fernandez-Gutierrez B *et al*: **GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis.** *Pharmacogenomics* 2013, **14**(7):727-734.



