

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA (B11.56.1)

Genómica y Farmacogenética de la Artritis Reumatoide: Resultados en el contexto del Consorcio REpAIR



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

JOSE MANUEL SÁNCHEZ MALDONADO

MAYO 2021, GRANADA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Manuel Sánchez Maldonado
ISBN: 978-84-1306-897-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/69085>

Abreviaturas

- ABCB1: Glucoproteína P1 (acrónimo del inglés, ATP binding cassette subfamily B member 1).
- Ac: Anticuerpo.
- Anti-CCP o ACPA: Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados.
- APCs: Células presentadoras de antígeno (acrónimo del inglés, antigen-presenting cells).
- ACR: Instituto americano de reumatología (acrónimo del inglés, The American College of Rheumatism).
- ACTH: Hormona adrenocorticotropa (acrónimo del inglés, adrenocorticotropic hormone).
- ADA: Adalimumab
- ADAMTs: Desintegrinas y metaloproteasa con motivos trombospondina (acrónimo del inglés, a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motif).
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AICD: Dominio intracelular de la molécula precursora amiloidea (acrónimo del inglés, Amyloid precursor protein intracytoplasmic domain).
- NSAIDs: Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (acrónimo del inglés, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs).
- AFA: Anticuerpo antifilagrina.
- AFP: Autoanticuerpos de factor antiperinuclear.
- Ag: Antígeno.
- AKA: Anticuerpo anti-queratina.
- ANA: Anticuerpos antinucleares.
- Anti-Sa: Anticuerpos antivimentina citrulinada.
- AKT: Proteína quinasa B (acrónimo del inglés, the serine-threonine protein kinase).
- AMPc: Adenosín monofosfato cíclico (acrónimo del inglés, cyclic adenosine monophosphate).
- Anti-CCP: Anticuerpos antipéptidos cíclico citrulinados (acrónimo del inglés, Anti-cyclic citrullinated peptides).
- Anti-TNF α : Anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral alpha (acrónimo del inglés, anti-tumor necrosis factor alpha).
- AP1: Proteína activadora 1 (acrónimo del inglés, Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit).
- AR: Artritis reumatoide.
- ARA: The American Rheumatism Association.

- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: ARN mensajero.
- ARPC1A: La subunidad 1A del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina (acrónimo del inglés, actin-related protein 2/3 complex subunit 1A).
- ASPIRE: Action to Support Practices Implement Research Evidence study.
- AUC: Área bajo la curva (acrónimo del inglés, area under the curve).
- ATG5: autofagia 5 (acrónimo del inglés, Autophagy related 5).
- AZA: Azatioprina.
- BAFF: Factor activador de células B (acrónimo del inglés, B cell activating factor belonging to the TNF family).
- BAFFR: Receptor del factor activador de células B (acrónimo del inglés, B cell activating factor belonging to the TNF family receptor).
- BCL2: Linfoma de células B 2 (acrónimo del inglés, B-cell CLL/lymphoma 2).
- BCMA: antígeno de maduración de célula B (acrónimo del inglés, B-cell maturation antigen).
- BCR: Receptor de las células B (acrónimo del inglés, B-cell receptor).
- BeST: the Behandel Strategieen study.
- BLK: Tirosina quinasa específica de linfocitos B (acrónimo del inglés, B-lymphocyte specific protein tyrosine kinase).
- C: símbolo en la tabla periódica para el carbono.
- CARD8: Caspase Recruitment Domain Family Member 8.
- CCL: Ligando de quimiocinas motivo C-C (acrónimo del inglés, C-C motif chemokine ligand).
- CCR: Receptor de quimiocinas motivo C-C (acrónimo del inglés, C-C motif chemokine receptor).
- CDAI: Índice de la actividad clínica de la enfermedad (acrónimo del inglés, Clinical disease activity index).
- CD: Grupo de diferenciación o antígeno de diferenciación (acrónimo del inglés, Cluster of differentiation).
- CI: Intervalo de confianza (acrónimo del inglés, confidence interval).
- COG6: Componente oligomérico 6 del complejo de Golgi (acrónimo del inglés, Component of oligomeric Golgi complex 6).
- CTCF: Factor de unión CCCTC (acrónimo del inglés, 11-zinc finger protein or CCCTC-binding factor).
- CTLA4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico (acrónimo del inglés, 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.
- CXCL: Ligando de quimiocinas motivo C-X-C (acrónimo del inglés, C-X-C motif chemokine ligand).

- CXCR: Receptor de quimiocinas motivo C-X-C (acrónimo del inglés, C-X-C motif chemokine receptor).
- c-Rel: proto-oncogen.
- DANBIO registry: Registro nacional danés para el tratamiento biológicos de la enfermedad reumática (acrónimo del inglés, The National Danish Registry for Biological Treatment of Rheumatic Disease).
- DAS: Puntuación de la actividad de la enfermedad (acrónimo del inglés, Disease activity score).
- DAS28: Puntuación de la actividad de la enfermedad en 28 articulaciones (siglas del inglés, Disease activity score 28).
- DCs: Células dendríticas (acrónimo del inglés, 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 (acrónimo del inglés, C-type lectin domain family 7 member A).
- DHEA-S: dehidroepiandrosterona sulfato (acrónimo del inglés, Dehydroepiandrosterone-Sulfate).
- DHODH: Dihidroorotato deshidrogenasa (quinona) (acrónimo del inglés, dihydroorotate dehydrogenase).
- DHT: 5 α -dihidrotestosterona (acrónimo del inglés, dihydrotestosterone).
- DRAP: database of rheumatoid arthritis related polymorphisms.
- DREAM registry: Registro nacional holandés para el tratamiento con biológicos de la enfermedad reumática (acrónimo del inglés, Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring).
- DKK1: Dickkopf-1.
- E2: Estradiol, oestradiol o 17 β -estradiol.
- ELAM-1: Moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (acrónimo del inglés, endothelial-leukocyte adhesion molecule 1).
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (acrónimo del inglés, Enzyme-linked immunosorbent assay).
- HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg (acrónimo del inglés Hardy-Weinberg equilibrium)
- EM: Expectation-maximization.
- ENCODE: Enciclopedia de ADN (acrónimo del inglés, The encyclopedia of DNA elements).
- EOMES: Gen eomesodermin.
- EPISER: Estudio de prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española.
- eQTL: Expresión cuantitativa característica de un loci (acrónimo del inglés, Expression quantitative trait loci).
- ESPOIR: Étude et Suivi des POLyarthrites Indifférenciées Récentes.
- ESR1: Receptor de estrógenos 1 (acrónimo del inglés, Estrogen receptor 1).

- ESR2: Receptor de estrógenos 2 (acrónimo del inglés, Estrogen receptor 2).
- ERBB2: Receptor de tirosina quinasa erb-b2 (acrónimo del inglés, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2).
- ETA: Etanercept.
- ETS1–FLI1: Factores de transcripción (acrónimo del inglés, E26 transformation-specific1 and friend leukemia integration 1).
- EULAR: Liga europea contra el reumatismo (acrónimo del inglés, The European League Against Rheumatism).
- EVA: Escala visual analógica.
- FAME: Fármaco modificador de enfermedad.
- FAS: Receptor de la superfamilia TNF (acrónimo del inglés, TNF-receptor superfamily 6).
- FasL: Ligando de FAS.
- Fc: Fracción constante, hace función de bisagra y proporciona la función biológica de la molécula.
- FcGR: Receptor gamma de la fracción constante de las inmunoglobulinas (acrónimo del inglés, Fc gamma receptor).
- FcGR2A: Subunidad IIa del receptor gamma de la fracción constante de las inmunoglobulinas (acrónimo del inglés, Fc fragment of IgG receptor IIa).
- FcGR3A: Subunidad IIIa del receptor gamma de la fracción constante de las inmunoglobulinas (acrónimo del inglés, Fc fragment of IgG receptor IIIa).
- FLS: Sinoviocitos similares a fibroblastos (acrónimo del inglés, fibroblast-like synoviocytes).
- FR: Factor reumatoide o reumatoideo.
- FSH: Hormona estimulante del folículo (acrónimo del inglés, Follicle stimulating hormone).
- GBG: Transportado de globulina unida a corticoesteroides (acrónimo del inglés, Corticosteroid Binding Globulin).
- GBP6: El miembro 6 de la familia de proteínas de unión a guanilato (acrónimo del inglés, Guanylate Binding Protein Family Member 6).
- GENEVAR: GENE Expression VARIation.
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (acrónimo del inglés, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor).
- GnRH: Hormona liberadora de gonotropina (acrónimo del inglés, Gonadotropin releasing hormone).
- GSTP1: Glutati6n S-transferasa P1 (acrónimo del inglés, Glutathione S-transferase Pi1).
- GWAS: Estudio de asociaci6n de genoma completo (acrónimo del inglés, genome-wide association study).
- HHEX: Proteína homeobox HHEX expresada hematopoyéticamente (acrónimo del inglés, Hematopoietically Expressed Homeobox).
- HFGP: Proyecto de Gen6mica Funcional en humanos (acrónimo del inglés, Human Functional Genomics Project).
- HHA: eje hipotálamo-hipofosario-adrenal.

- HLA: Antígeno leucocitario humano (acrónimo del inglés, human leukocyte antigen).
- HLA-DR SE: Epítipo compartido HLA-DR (acrónimo del inglés, HLA-DR shared epitope).
- Hsp: proteína de choque térmico (acrónimo del inglés, human shock protein).
- HSD17B1: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (acrónimo del inglés, Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 1).
- HVR3: tercera región hipervariable.
- ICs: Inmunocomplejos.
- ICAM-1: Moléculas de adhesión endoteliales (acrónimo del inglés, Intercellular Adhesion Molecule 1).
- IFN: Interferones humanos tipo I
- IFP: interfalángicas proximales.
- IFX: Infliximab.
- Ig: Inmunoglobulina, siglas seguidas de una letra que indica el tipo.
- IGFBP2: proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (acrónimo del inglés, Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2).
- IL: Interleucina, 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.
- IKKB: Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta (acrónimo del inglés, Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta).
- IKKs: Enzima serina-treonina quinasa, complejo multiproteico.
- IRAK1: Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1 (acrónimo del inglés, Interleukin 1 receptor associated kinase 1).
- IR: Índice de Ritchie.
- IRF: Factor regulador de interferones (acrónimo del inglés, Interferon regulatory factor).
- IRM: Imagen de resonancia magnética.
- kD: Kilodaltons.
- KIR: células asesinas, receptores similares a la familia de las inmunoglobulinas (acrónimo del inglés, Killer cell Immunoglobuline-like receptors).
- KLRC1: Celulas asesinas, receptores similares a la familia de las lectinas C1 (acrónimo del inglés, killer cell lectin like receptor C1).
- KLRK1 | KLRC4: Killer Cell Lectin Like Receptor K1/ Killer Cell Lectin Like Receptor C4.
- LBH: Regulador de la vía de señalización Wnt (acrónimo del inglés, Limb bud and heart development gene).
- LD: Desequilibrio de ligamiento (acrónimo del inglés, linkage disequilibrium).
- LFN: leflunomida.
- LH: Hormona luteinizante (acrónimo del inglés, Luteinizing hormone).
- LPS: lipopolisacárido.
- LT β R: receptor de linfotoxina β (acrónimo del inglés, lymphotoxin β receptor).
- MAF: Frecuencia mínima del alelo (acrónimo del inglés, Minor allele frequency).

- MAPK1: Proteína kinasa activadora de mitogeno (acrónimo del inglés, Mitogen-activated protein kinase 1).
- MBDA: Múltiples marcadores de la actividad de la enfermedad (acrónimo del inglés, multi-biomarker disease activity).
- MCF: Metacarpofalángicas.
- MCP1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (acrónimo del inglés, monocyte chemoattractant protein-1, también conocido como C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)).
- mDCs: Células dendríticas Mieloides (acrónimo el inglés, Myeloid dendritic cells).
- mo-DCs: Células dendríticas Monocitos (acrónimo el inglés, Monocytes derived dendritic cells).
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (acrónimo del inglés, Major histocompatibility complex).
- MISS: Proteína de membrana iniciadora de la señalización de esteroides (acrónimo del inglés, Membrane initiated steroid signaling).
- MMP: Metaloproteinasas de la matriz extracelular (acrónimo del inglés, matrix metalloproteinase).
- MTX: Metrotexato.
- NAD28: número de articulaciones dolorosas sobre 28 articulaciones.
- NAT28: número de articulaciones tumefactas sobre 28 articulaciones.
- NAT44: número de articulaciones tumefactas sobre 44 articulaciones.
- NFκB: Factor nuclear de Kappa B (acrónimo del inglés, Nuclear Factor-kappa B).
- NK: Células asesinas (acrónimo del inglés, Natural killers).
- NLRP3: Dominio de pirina de la familia NLR (acrónimo del inglés, NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3).
- NLS: Secuencias de localización nuclear (acrónimo del inglés, Nuclear, Localization Sequence).
- NR1I2: Factor transcripcional nuclear (acrónimo del inglés, nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2).
- NTC: Control negativo, ausencia de material biológico (acrónimo del inglés, No Template Control).
- OMERACT: Outcome measures in rheumatoid arthritis clinical trials.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- OR: Odds ratio.
- PAD: Enzima peptidoarginil deaminasa (acrónimo del inglés, Peptidyl arginine deiminase).
- PADI4: Enzima peptidoarginil deaminasa 4 (acrónimo del inglés, Peptidyl arginine deiminase 4).
- PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (acrónimo del inglés, Peripheral blood mononuclear cell).
- PCR: Proteína C-reactiva.
- pDCs: Células dendríticas plasmacitoides (acrónimo del inglés, Plasmacytoid dendritic cell).

- PDGFB: Subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (acrónimo del inglés, Platelet Derived Growth Factor Subunit B).
- PGPS: Polisacárido peptidilglicano.
- PGR: Receptor de la progesterona (acrónimo del inglés, Progesterone receptor).
- PHA: Polihidroxicanoatos.
- PI3K: Fosfoinositol 3-quinasas o Fosfoinositida-3-quinasas (acrónimo del inglés, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha).
- PICS: Identificación probabilística de SNPs causales (acrónimo del inglés, Probabilistic identification of causal SNPs).
- PKA: Protein kinase A.
- PRDM1: Dominio 1 del receptor de la progesterona (acrónimo del inglés, Progesterone receptor domain 1).
- Prueba LR: Prueba de razón de verosimilitud (acrónimo del inglés, Likelihood rate test).
- PTPN1: Tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 1 (acrónimo del inglés, Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1).
- PTPN22: Tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 1 (acrónimo del inglés, Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22).
- RAD51B: Proteína de reparación de ADN RAD51 homolog 2 (acrónimo del inglés, RADiation sensitive 51 paralog B).
- RAMRIS: Puntuación para resonancia magnética en artritis reumatoide (acrónimo del inglés, rheumatoid arthritis magnetic resonance imaging score).
- RANK: Receptor activador para factor nuclear kB (acrónimo del inglés, Receptor Activator for Nuclear Factor kB).
- RANKL: Ligando de RANK (acrónimo del inglés, Receptor Activator for Nuclear Factor kB Ligand).
- ESRs: receptores de estrógenos (acrónimo del inglés, estrogen receptors).
- REL: Reticuloendoteliosis oncogene.
- RelA: Receptor de REL.
- RelB: Receptor de REL.
- REpAIR: *RhEumatoid Arthritis International Research consortium*.
- RHD: Dominio de región homóloga (acrónimo del inglés, REL homology Domain).
- ROS: Especies reactivas de oxígeno (acrónimo del inglés, Reactive Oxygen Species).
- RP: Receptor de progesterona (acrónimo del inglés, Progesterone receptor).
- SCORE: Evaluación sistemática del riesgo coronario (acrónimo del inglés, systematic coronary risk evaluation).
- SDAI: Índice simplificado de la actividad de la enfermedad (acrónimo del inglés, Simplified disease activity index).
- SE: Epítipo compartido (acrónimo del inglés, share epitope)
- SER: Sociedad Española de Reumatología.

- SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales (acrónimo del inglés, Sex hormone binding globulin).
- SNP: Polimorfismo de nucleótido único (acrónimo del inglés, Single nucleotide polymorphism).
- STAT4: Transductor de señal y el activador de la transcripción 4 (acrónimo del inglés, Signal transducer and activator of transcription 4).
- SULT1A1: Sulfotransferasa 1A-dehidroepiandrosterona tipo 1 (acrónimo del inglés, Sulfotransferase Family 1A Member 1).
- SULT2A1: Sulfotransferasa 2A-dehidroepiandrosterona tipo 1 (acrónimo del inglés, Sulfotransferase Family 2A Member 1).
- SWEFOT: Analysis of the Swedish Farmacotherapy Study.
- SYNGR1: Sinaptogirina 1 (acrónimo del inglés, Synaptogyrin-1).
- SSZ: sulfasalazina.
- TACI: Activador transmembrana e interactor CAML (acrónimo del inglés, Transmembrane activator and CAML interactor).
- TAD: Dominio de activación transcripcional (acrónimo del inglés, transcription activation domain).
- TCR: Receptor de células T (acrónimo del inglés, T cell receptor).
- Th: Células T colaboradoras (acrónimo del inglés, T cell helper).
- TIM-3: Proteína 3 con dominio mucina e inmunoglobulina de células T (acrónimo del inglés, T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3).
- TLR: Receptor tipo toll (acrónimo del inglés, toll like receptor).
- TRAF1/C5: Factor 1 asociado al receptor de TNF/Componente del complemento 5 (acrónimo del inglés, TNF receptor associated factor 1/complement component 5).
- Treg: Células T reguladoras (acrónimo del inglés, T cell regulatory).
- TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa (acrónimo del inglés, tumor necrosis factor alpha).
- TNF α IP3: Proteína inducible de TNF α (acrónimo del inglés, TNF α induced protein 3).
- TNFRSF: Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (acrónimo del inglés, TNF α receptor superfamily).
- TGF: Factor de Crecimiento Transformante (acrónimo del inglés, transforming growth factor).
- THOP1: Oligopeptidasas de Thimet (acrónimo del inglés, Thimet Oligopeptidase 1).
- TP53: Proteína tumoral P53 (acrónimo del inglés, tumoral protein P53).
- TYK2: Tirosina quinasa 2, (acrónimo del inglés, tyrosine kinase 2).
- UBASH3A: Proteína A asociada con ubiquitina y que contiene el dominio SH3 (acrónimo del inglés, Ubiquitin associated and SH3 domain containing A).
- UBE2L3: Enzima conjugadora de ubiquitina E2 L3, también llamada UBCH7 (acrónimo del inglés, Ubiquitin conjugating enzyme E2 L3).

- USF1: Factor de transcripción (acrónimo del inglés, Upstream Transcription Factor 1).
- UTR: Región no traducida (acrónimo del inglés, untranslated region).
- UVB: Ultravioleta B.
- VCAM-1: Proteína 1 de adhesión celular vascular (acrónimo del inglés, Vascular Cell Adhesion Molecule 1).
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (acrónimo del inglés, Vascular endothelial growth factor).
- VGP: Valoración global del paciente.
- VSG: Velocidad de Sedimentación Globula (acrónimo del inglés, Erythrocyte sedimentation rate).
- ZKSCAN5: Zinc Finger with KRAB And SCAN Domains 5.

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria, común y compleja que se caracteriza por una inflamación sistémica y simétrica que afecta a las principales articulaciones, provocando a lo largo del tiempo la progresiva destrucción del cartílago y el hueso. La incidencia de la enfermedad a nivel mundial oscila alrededor del 1%, teniendo mayor prevalencia en mujeres que en hombres (~4/1) que suelen presentar síntomas más severos, una respuesta terapéutica menos eficiente y un peor pronóstico. Si no se controla adecuadamente, la AR puede provocar una grave discapacidad e incluso una muerte prematura, lo que pone de manifiesto la importancia de esta patología en la sociedad actual.

Aunque la etiopatogenia de la AR es aún desconocida en gran medida, sabemos que la presencia de ciertas alteraciones genéticas, así como factores hormonales y ambientales están implicados en su desarrollo y en su progresión. En las últimas décadas se han realizado múltiples estudios genéticos de diversa envergadura con el objetivo de identificar las alteraciones genéticas implicadas en la susceptibilidad a desarrollar AR y que contribuyen al fracaso terapéutico y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la información relevante que estos estudios han aportado, debemos reconocer que todavía estamos lejos de una posible implementación a nivel clínico que permitiera la estratificación efectiva de los pacientes en base a su perfil genético de riesgo o de respuesta terapéutica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el de estudiar el impacto de ciertas alteraciones genéticas en los receptores de los estrógenos y la progesterona y genes implicados en el transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas, así como en genes de vías de señalización implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria. Al mismo tiempo, evaluamos si los marcadores genéticos seleccionados en estas rutas y aquellos identificados por GWAS podrían jugar un papel destacado en la regulación de la respuesta frente a fármacos anti-TNF α y la aparición de erosiones óseas. Considerando las diferencias de incidencia entre sexos y el papel atribuido al factor reumatoide o los anticuerpos anti-peptídicos citrulinados (FR y anti-CCP) en la modulación de la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad, decidimos además evaluar si el efecto de los marcadores genéticos seleccionados podía verse afectado por estos factores. Finalmente, con el objetivo de trasladar nuestros hallazgos a la práctica clínica elaboramos modelos predictivos con el fin de predecir con mayor certeza la respuesta terapéutica a los diversos fármacos anti-TNF que se usan en la práctica clínica. Todos los estudios genéticos se desarrollaron en el contexto del consorcio internacional REpAIR (*RhEumatoid Arthritis International Research consortium*) que nuestro grupo coordina.

Índice



Índice

| | |
|--|----|
| <i>Antecedentes</i> | 1 |
| 1. Artritis Reumatoide | 3 |
| 1.1. ¿Qué es la artritis reumatoide?..... | 3 |
| 1.1.1. Características generales de la AR. | 3 |
| 1.1.2. Criterios clínicos de la AR. | 11 |
| 1.1.3. Pruebas de Diagnóstico de la AR..... | 16 |
| 1.2. Epidemiología y etiología de la artritis reumatoide. | 19 |
| 1.2.1. Incidencia y prevalencia. | 19 |
| 1.2.2. Factores de riesgos de susceptibilidad de la enfermedad..... | 21 |
| 2. Fisiopatología de la AR | 25 |
| 3. Inmunología de la AR | 27 |
| 3.1. Macrófagos..... | 29 |
| 3.2. Células dendríticas..... | 30 |
| 3.3. Monocitos..... | 31 |
| 3.4. Neutrófilos..... | 31 |
| 3.5. Basófilos..... | 32 |
| 3.6. Mastocitos. | 32 |
| 3.7. Osteoblastos y osteoclastos. | 32 |
| 3.8. Condrocitos..... | 33 |
| 3.9. Fibroblastos. | 33 |
| 3.10. Linfocitos T..... | 34 |
| 3.10.1. Linfocitos T cooperadores o células T helper (células T CD4 ⁺). | 34 |
| 3.10.2. Linfocitos T citotóxicos (Células T CD8 ⁺). | 35 |
| 3.10.3. Linfocitos T reguladores (células Treg). | 35 |
| 3.10.4. Las células “ <i>natural killer</i> ” (Células NK). | 35 |
| 3.11. Linfocitos B. | 36 |
| 3.12. Citocinas y quimiocinas relevantes en la AR. | 37 |
| 3.12.1. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias en la AR. | 38 |
| 3.12.2. Citocinas con efecto antiinflamatorio en AR. | 40 |
| 4. Genética de la AR | 41 |
| 4.1. Historia y evolución de la genética en la AR. | 42 |
| 4.2. Mapeo genético por estudios de desequilibrio de ligamiento. | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3. Estudios de genes candidato..... | 43 |
| 4.4. Estudio de asociación de genoma completo..... | 44 |
| 4.4.1. Región del gen <i>HLA</i> | 45 |
| 4.4.2. Regiones no <i>HLA</i> | 47 |
| 4.5. Modelos predictivos de riesgo genético y respuesta terapéutica en AR..... | 49 |
| 5. Las hormonas esteroideas y su papel en AR..... | 50 |
| 5.1. Implicación y regulación de las hormonas esteroideas en las diferentes etapas de las mujeres a lo largo de su vida y el papel que desempeña las hormonas esteroideas en pacientes con AR..... | 50 |
| 5.2. Efecto de las hormonas esteroideas en los distintos tipos celulares..... | 52 |
| 6. El papel de la vía NFκB y sus variantes en la AR. | 54 |
| 6.1. Vías de señalización mediadas por el NFκB. | 55 |
| 6.1.1. Activación de NFκB por la vía canónica..... | 55 |
| 6.1.2. Activación de NFκB por la vía no canónica..... | 55 |
| 6.1.3. Activación de NFκB por la vía atípica. | 56 |
| 6.2. Regulación postranscripcional de NFκβ..... | 56 |
| 6.3. Vías de señalización de NFκB, asociado con la AR..... | 56 |
| 7. Estrategias terapéuticas en la AR..... | 57 |
| 7.1. Tratamientos biológicos y no biológicos. | 57 |
| 7.1.1. Tratamiento de primera línea o elección (fármacos no biológicos)..... | 58 |
| 7.1.2. Fármacos biológicos..... | 60 |
| 7.2. Evaluación de la respuesta a los fármacos anti-TNF en AR..... | 62 |
| 7.3. Efectos secundarios y contraindicaciones de los tratamientos anti-TNF | 63 |
| 7.4. Clasificación de la remisión en pacientes con AR..... | 63 |
| <i>Justificación</i> | 65 |
| <i>Objetivos</i> | 69 |
| <i>Materiales y Métodos</i> | 73 |
| 1. Diseño | 75 |
| 2. Centro donde se desempeñó el trabajo | 75 |
| 3. Sujetos de estudio | 75 |
| 4. Población de estudio | 75 |
| 4.1. Población de estudio según el tratamiento anti-TNF..... | 76 |
| 4.1.1. Población de estudio REpAIR: pacientes tratados con anti-TNF | 77 |
| 4.1.2. Población de replicación para individuos tratados con anti-TNF | 77 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.3. Criterios de admisión en los estudios genéticos..... | 77 |
| 5. Selección de los SNP del estudio. | 78 |
| 6. Muestras biológicas y base de datos clínica | 80 |
| 7. Extracción del material genético y determinación del factor reumatoide y los anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados..... | 81 |
| 8. Genotipado de las variantes genéticas seleccionadas | 81 |
| 9. Pruebas estadísticas..... | 82 |
| 9.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg..... | 82 |
| 9.2. Análisis de asociación..... | 82 |
| 9.3. Análisis del poder estadístico | 82 |
| 9.4. Meta-análisis..... | 83 |
| 9.5. Análisis de haplotipos..... | 83 |
| 9.6. Análisis eQTL e <i>in silico</i> de la funcionalidad de los SNPs..... | 84 |
| 9.7. Análisis de modelos predictivos..... | 84 |
| 10. Ensayos de análisis funcionales de SNPs relacionadas con las hormonas esteroideas..... | 87 |
| 11. Determinación de los niveles serológicos de hormonas esteroideas..... | 88 |
| 12. Correlación entre los polimorfismos genéticos y 91 subpoblaciones derivadas de la sangre periférica..... | 90 |
| 13. Análisis de correlación de los marcadores genéticos y 103 proteínas inflamatorias en suero..... | 91 |
| <i>Resultados y Discusión</i>..... | 93 |
| ARTÍCULO Nº 1..... | 95 |
| 1. Características de la población de estudio..... | 96 |
| 2. Análisis de asociación..... | 97 |
| 3. Análisis de Haplotipos..... | 102 |
| 4. Análisis de modelos predictivos. Curva ROC..... | 103 |
| 5. Discusión..... | 105 |
| ARTÍCULO Nº 2..... | 109 |
| 1. Características de la población de estudio..... | 110 |
| 2. Análisis de asociación y análisis de Haplotipos..... | 113 |
| 3. Correlación de los SNPs con los niveles de las hormonas esteroideas..... | 121 |
| 4. Correlación de los SNPs seleccionados con niveles de citocinas..... | 122 |
| 5. Análisis de modelos predictivos. Curva ROC..... | 124 |

| | |
|---|------------|
| 6. Discusión..... | 127 |
| ARTÍCULO Nº 3..... | 132 |
| 1. Características de la población de estudio..... | 133 |
| 2. Análisis de asociación de las variantes de la vía NFκB y el riesgo a AR. | 134 |
| 3. Análisis de asociación de las variantes en la vía NFκB y la respuesta a fármacos anti-TNF. | 141 |
| 4. Discusión..... | 145 |
| ARTÍCULO Nº 4..... | 149 |
| 1. Características de la población de estudio..... | 150 |
| 2 Análisis de asociación de los SNPs identificadas en estudios GWAS en respuesta a fármacos inhibidores de TNF..... | 151 |
| 3. Caracterización funcional de los resultados más relevantes. | 156 |
| 4. Discusión..... | 158 |
| <i>Conclusiones</i> | 163 |
| <i>Artículos</i> | 167 |
| <i>Agradecimientos</i> | 295 |
| <i>Referencias</i> | 299 |

Índice.

- Figuras y Tablas:

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Simetría articular de las manifestaciones clínicas en AR..... | 4 |
| Figura 2. | Articulación sana frente a la progresión del daño articular en AR..... | 4 |
| Tabla 1. | Características clínicas en AR (articulares y extraarticulares). | 5 |
| Figura 3. | Algunas afectaciones extraarticulares en pacientes con AR crónica..... | 6 |
| Figura 4. | Diferencias y alteraciones entre una articulación sana y otras con AR..... | 6 |
| Figura 5. | Isotipos de FR..... | 8 |
| Figura 6. | Proceso de citrulinación..... | 9 |
| Tabla 2. | Sensibilidad de diagnóstico de varias pruebas de detección comparando FR y anti-CCP*..... | 9 |
| Tabla 3. | Biomarcadores que pronostican la severidad de la AR. | 10 |
| Figura 7. | Curso de la enfermedad, en función de la inflamación articular, lesiones radiológicas e incapacidad..... | 11 |
| Figura 8. | Criterios del ACR/EULAR 2010 para la evaluación del riesgo de AR..... | 13 |
| Tabla 4. | Valoración de los criterios clínicos incluidos en los criterios ACR/EULAR 2010. .. | 14 |
| Figura 9. | Escala visual analógica (EVA). | 14 |
| Tabla 5. | Fórmula y categorización de la actividad de la enfermedad en función del DAS. 15 | |
| Tabla 6. | Fórmula y categorización de la actividad de la enfermedad según el DAS28. | 16 |
| Figura 10. | Imágenes de diagnóstico del daño erosivo provocado por la AR en la articulación de la muñeca. | 18 |
| Figura 11. | Imágenes de diagnóstico del daño erosivo provocado por la AR en diversas articulaciones..... | 18 |
| Tabla 7. | Incidencia y prevalencia de AR en población europea y norteamericana. | 20 |
| Tabla 8. | Prevalencia de AR en diferentes regiones del mundo..... | 20 |
| Figura 12. | Prevalencia mundial de la artritis reumatoide. | 20 |
| Figura 13. | Cuatro estudios de prevalencia de la AR en España..... | 21 |
| Figura 14. | Prevalencia de AR en mujeres y hombres, en diferentes poblaciones del mundo. | 22 |
| Figura 15. | Factores que contribuyen al inicio de la AR..... | 25 |
| Figura 16. | Respuesta inmunitaria Innata y adaptativa..... | 29 |
| Figura 17. | Esquemas de los distintos tipos celulares del sistema inmunitario y su localización de acción. | 37 |
| Figura 18. | Interacción entre las citocinas proinflamatorias y los distintos tipos celulares en la patogénesis de la AR..... | 40 |
| Tabla 9. | Resumen de las citocinas más relevantes en la patogénesis de la AR y su contexto celular e inmunológico. | 41 |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 19. Esquema de la heredabilidad atribuida a los loci asociados con AR en población europea. | 42 |
| Figura 20. Primer estudio de asociación de genoma completo en AR. | 44 |
| Figura 21. Lista de los genes identificados mediante estudios GWAS en AR organizados y visualizadas según su posición en los distintos cromosomas. | 45 |
| Figura 22. Esquema y estructura de la región HLA. | 46 |
| Tabla 10. HLAB*SE y su significancia clínica en la AR. | 47 |
| Figura 23. Localización del HLA-DRB1*SE en la molécula HLA de clase II y secuencias de aminoácidos que codifican para el EC. | 47 |
| Figura 24. Esquema de la activación de la vía canónica de NFκB y esquema de la activación de la vía no canónica de NFκB, respectivamente. | 56 |
| Tabla 11. Resumen de los fármacos FAMES y dosis aplicadas en la AR. | 60 |
| Figura 25. Tipos de Agentes biológicos usado frente a la AR. | 62 |
| Tabla 12. Resumen de las dosis y vía de administración de los fármacos anti-TNF. | 62 |
| Tabla 13. Clasificación de la respuesta en función del DAS28. | 63 |
| Tabla 14. Instrumentos para medir la actividad y la remisión de la enfermedad. | 64 |
| Figura 26. Esquema de todos los miembros colaboradores del consorcio REpAIR. | 76 |
| Figura 27. Selección de los genes relacionados con las rutas de señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 28. Selección de los genes relacionados con la vía NFκB. | ¡Error! Marcador no definido. |
| Figura 29. Esquema del procedimiento usado en los materiales y métodos. | 86 |
| Figura 30. Procedimiento usado en ensayos funcionales (análisis de los niveles de 9 citocinas y 7 hormonas esteroideas). | 89 |
| Tabla 15. Los 91 sub tipos celulares analizados en sangre periférica y PBMCs. | 90 |
| Tabla 16. 103 proteínas inflamatorias en suero. | 92 |
| Tabla 17. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con AR. | 97 |
| Tabla 18. Selección de SNPs de receptores de hormonas y transporte, en enzimas metabolizadoras de fase I y II. | 98 |
| Tabla 19. Meta-análisis para la asociación ente los SNPs de las hormonas esteroideas y cambio relativo en los valores de DAS28. | 100 |
| Figura 31. Meta-análisis de los SNPs CYP3A4 y CYP2C9 asociados con la respuesta a fármacos anti-TNF. | 102 |
| Tabla 20. Análisis de haplotipos en relación a la respuesta a fármacos anti-TNF. | 103 |
| Tabla 21. Valor discriminativo AUC para los modelos incluyendo los SNPs relacionados con las hormonas esteroideas. | 104 |
| Figura 32. Análisis de la curva ROC. En esta curva se resumen la capacidad predictiva de casa modelo en particular. | 105 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 22. Datos demográficos y clínicos globales y estratificados por la presencia de erosiones de los pacientes con AR (REpAIR). | 111 |
| Tabla 23. Datos demográficos y clínicos globales y estratificados por la presencia de erosiones de los pacientes con AR (DREAM). | 112 |
| Tabla 24. Lista de los 41 SNPs en genes relacionados con la señalización, transporte y metabolismo de hormonas esteroideas. | 113 |
| Tabla 25. Asociación de la población REpAIR y estratificada por FR entre los polimorfismos relacionados con las hormonas esteroideas y el riesgo a tener erosiones óseas. | 117 |
| Tabla 26. Replicación de las mejores asociaciones de interés entre los polimorfismos relacionados con las hormonas esteroideas y el riesgo a desarrollar enfermedad erosiva y el meta-análisis. | 119 |
| Figura 33. Correlación de los SNPs <i>CYP2C9</i> _{rs1799853} y <i>ESR1</i> _{rs2881766} con la vitamina D3 y los niveles de la progesterona en mujeres (n =107) y hombres (n =172). | 121 |
| Figura 34. Correlación de los polimorfismos relacionado con las hormonas esteroideas con los niveles de citocinas, (n = 408). | 123 |
| Tabla 27. Modelo predictivo que incluye los SNPs relacionados con las hormonas esteroideas en las poblaciones de REpAIR y el registro DREAM. | 125 |
| Figura 35. Análisis de curva ROC en las poblaciones de REpAIR y el registro DREAM. | 126 |
| Tabla 28. Características demográficas y clínicas de los pacientes con AR. | 134 |
| Tabla 29. Variantes genéticas seleccionada en la ruta de señalización de NFκB. | 135 |
| Tabla 30. Análisis de asociación global y estratificado por anti-CCP de los SNPs relacionados con la vía NFκB y el riesgo a AR en REpAIR. | 137 |
| Tabla 31. Meta-análisis para la asociación de los SNPs de la vía NFκB e inflamasoma y el riesgo a desarrollar AR en pacientes anti-CCP ⁺ | 139 |
| Tabla 32. Análisis de haplotipos de la población total y estratificada por anti-CCP asociada con el AR. | 140 |
| Figura 36. Meta-análisis de la asociación entre el SNP NFκB _{rs11574851} y el riesgo de AR en pacientes anti-CCP ⁺ | 140 |
| Tabla 33. Meta-análisis de la asociación de los SNPs en la vía NFκB y el cambio relativo del DAS28. | 144 |
| Figura 37. Meta-análisis de la asociación de la variante <i>NFκB2</i> _{rs1056890} con la respuesta a fármacos anti-TNF. | 145 |
| Figura 38. Correlación de los niveles de IL10 con el polimorfismo NFκB2 _{rs1056890} tras la estimulación de PBMCs con LPS (n=377). | 145 |
| Tabla 34. Características demográficas y clínicas. | 150 |
| Tabla 35. Variantes genéticas indentificadas en GWAS asociadas con respuesta a fármacos anti-TNF. | 151 |
| Tabla 36. Estudio de asociación en la población general y estratificada por FR de polimorfismos seleccionados y la respuesta a fármacos anti-TNF (definido por DAS28). | 153 |

Tabla 37. Meta-análisis en la población general y estratificada por FR de los polimorfismos *CNTN5*_{rs1813443}, *MAFB*_{rs6071980}, *LINC02549*_{rs7767069} y *LRRC55*_{rs717117} y la respuesta a fármacos anti-TNF (definido por DAS28). 155

Figura 39. Correlación de la variante *LINC02549*_{rs7767069} con el número de células T CD45RO+CD45RA+..... 157

Figura 40. Correlación de la variante *LRRC55*_{rs717117}, con los niveles de IL6. 158

Figura 41. correlación de la variante *MAFB*_{rs6071980} con CCL23 y FGF-19 modulando la inflamación en respuesta a fármacos anti-TNF, respectivamente. 158

Antecedentes



1. Artritis Reumatoide

1.1. ¿Qué es la artritis reumatoide?

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria grave y común que está caracterizada por una inflamación simétrica y crónica de las articulaciones que cursa con dolor, deformación progresiva de las mismas por hiperplasia y destrucción del tejido sinovial adyacente y el hueso. Si no se trata, la AR puede provocar invalidez, pérdida de funcionalidad y calidad de vida y puede ocasionar alteraciones significativas en tejidos u órganos extraarticulares, lo que eventualmente puede traducirse en una mortalidad precoz.

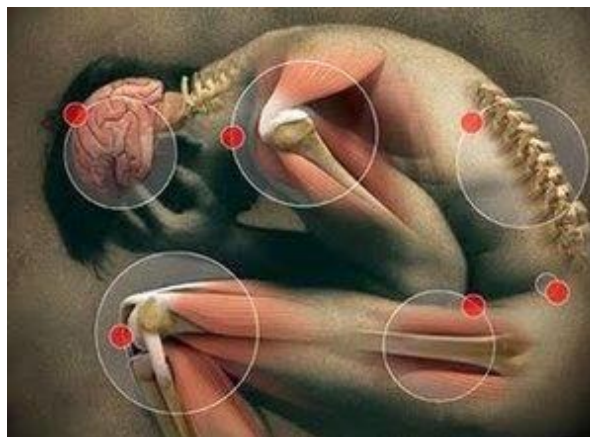
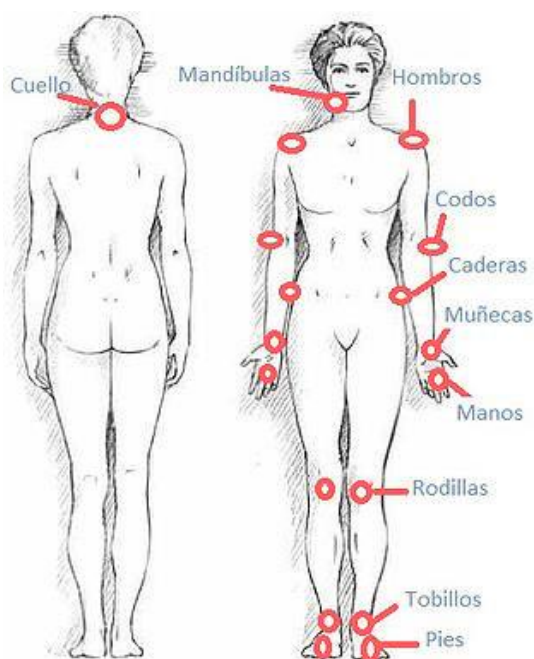
1.1.1. Características generales de la AR.

La AR es una enfermedad clínicamente muy heterogénea con importantes diferencias no sólo entre pacientes, sino también entre las distintas fases por las que transcurre la enfermedad. Surge de manera lenta y los primeros signos que predominan son el dolor, la rigidez y la inflamación simétrica que afectan a pequeñas y grandes articulaciones acompañándose en las zonas afectadas de calor, enrojecimiento, entumecimiento e hinchazón [1-3]. Esta sintomatología suele manifestarse principalmente durante las primeras horas de la mañana (Figura 1). Si no se trata adecuadamente, la enfermedad avanza con cierta rapidez, se cronifica y como consecuencia la sintomatología y signos clínicos se vuelven más severos provocando un deterioro muy acentuado de las articulaciones (pérdida de cartílago con daños en estructuras blandas como ligamentos y tendones) y la destrucción progresiva del tejido óseo. En los casos más extremos estas alteraciones pueden dar lugar a deformaciones óseas, invalidez e incluso determinar una mortalidad precoz [2-4](Figura 2).

Según el estudio EPISER desarrollado en España, la AR es un desorden autoinmunitario asociado con una limitación física (los pacientes pierden el 80% de la movilidad en las articulaciones) [4], que se traduce en una peor calidad y esperanza de vida, donde un 84.6% de los casos son incapaces de realizar actividades cotidianas y rutinarias como tareas del hogar, caminar, abrir recipientes o, coger peso entre otros ejemplos. En este estudio se describe que los pacientes con AR disminuyen su esperanza de vida de 5 a 10 años y un gran porcentaje de ellos desarrolla discapacidades graves durante los primeros 10 años tras el diagnóstico y entorno a la mitad (un 55.7%) necesita ayuda de terceras personas en su vida cotidiana.

La AR, como otras patologías autoinmunitarias, es sistémica y, por ello, los pacientes presentan síntomas sistémicos y no solo relacionados con las articulaciones como son la fatiga o el cansancio, el entumecimiento, el hormigueo o ardor de manos y pies o la existencia de dificultades para conciliar el sueño y, ocasionalmente, presentar picos febriles.

Figura 1. Simetría articular de las manifestaciones clínicas en AR.



En la figura se muestra que la sintomatología clínica afecta tanto a las articulaciones pequeñas (interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, metatarsfalángicas y muñecas) como a las grandes articulaciones (codos, hombros, rodillas, tobillos y caderas).

Figura 2. Articulación sana frente a la progresión del daño articular en AR.



Se muestra la progresión de la enfermedad a nivel macroscópico de las articulaciones y debido a esta reacción del cuerpo frente a lo propio y la hiperactividad de procesos proinflamatorios se ocasiona la sintomatología que se observa en pacientes con AR.

Junto a los síntomas más representativos, durante el transcurso de la enfermedad, pueden aparecer otras afectaciones extraarticulares (aproximadamente en un 20% de los pacientes con AR) (Tabla 1) que aumentan la severidad de la enfermedad y, en ocasiones, pueden provocar la mortalidad del individuo [5]. Las afectaciones clínicas extraarticulares más frecuentes son los nódulos reumatoideos (asociados al factor reumatoide positivo) que están constituidos por bultos bajo la piel de tejido inflamatorio y cicatricial que, generalmente, aparecen en zonas de roce como los codos, el dorso de las manos y pies, la parte posterior de la cabeza, o los talones, entre otros. Estos nódulos pueden aparecer en zonas internas del cuerpo, normalmente no constituyen un riesgo para la salud y suelen desaparecer espontáneamente con el tratamiento, aunque en ocasiones se puede recurrir a la cirugía para su extirpación (Figura 3 y 4).

Otras complicaciones extraarticulares 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), el síndrome de Felty, dolor torácico al respirar (pleuresía), inflamación y atrofia de las glándulas que secretan las lágrimas, la saliva, los jugos digestivos o el flujo vaginal (similar al síndrome de Sjörgren), pericarditis, miocarditis o incluso insuficiencia cardíaca (Figura 3). Aunque las afectaciones principales de esta enfermedad se centran en las articulaciones, no hay que restarles importancia a las complicaciones extraarticulares, puesto que a menudo son causa de una mortalidad prematura [6-11].

Tabla 1. Características clínicas en la AR (articulares y extraarticulares).

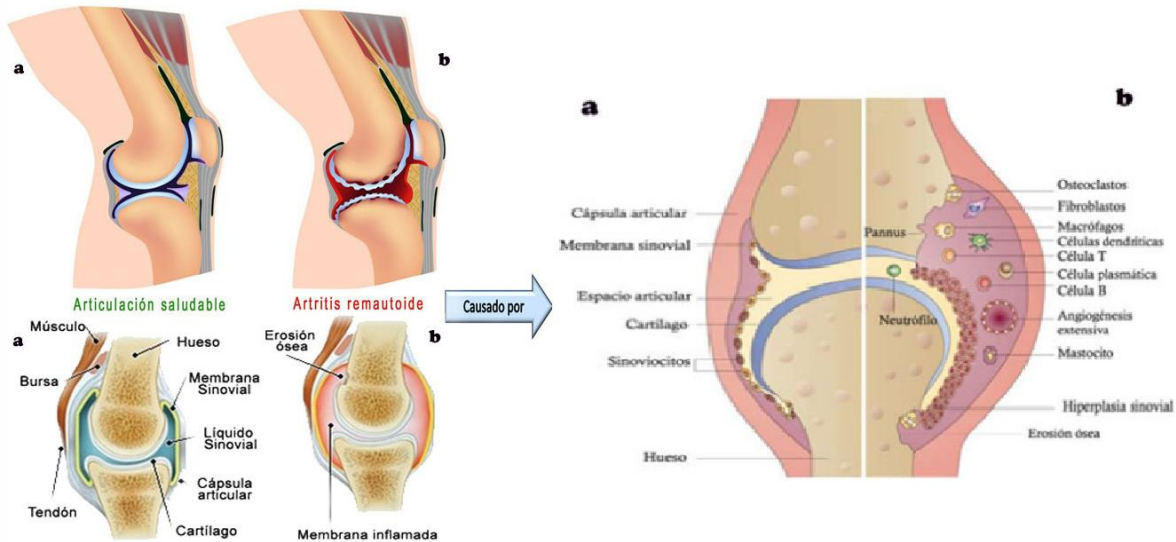
| CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LA AR | | |
|--|-----------------------------|---|
| Síntomas | Características Articulares | Características Extraarticulares |
| Inflamación de las Articulaciones | Blandas al tacto | Nódulos reumáticos, vasculitis (piel) |
| Dolor/Rigidez | Engrosamiento sinovial | Queratoconjuntiva sicca, Iritis, Episcleritis (Ocular) |
| Debilidad | Efusión (al inicio) | Inflamación salivar (Oral) |
| Deformación | Eritema (Al inicio) | Fibrosis pulmonar, efusión pleural, inflamación cricoaritenoides (Respiratorio) |
| Cansancio | Dificultad de movimiento | Mononeuritis, Pinzamiento, inestabilidad cervical (Neurológico) |
| Malestar | Anquilosis | Anemias, trombocitosis, leucocitosis, linfadenopatías (Hematología) |
| Fiebre | Subluxación | Arterioesclerosis |
| Pérdida de peso | | Vasculitis reumatoidea |
| Depresión | | Lesiones de columna |
| Dificultad para dormir | | Aumento de aminotransferasas (hepático) |
| | | Enfermedades cardiovasculares |

Figura 3. Algunas afectaciones extraarticulares en pacientes con AR crónica.



En esta imagen se observan características extraarticulares que desarrollan los pacientes con AR, de izquierda a derecha: Vasculitis Reumatoide; Nódulos Reumáticos; Fenómeno de Raynaud; Síndrome de Felty.

Figura 4. Diferencias y alteraciones entre una articulación sana y otras con AR.



En esta figura se compara una articulación sana (a), frente a una con AR (b), donde se observa de forma esquemática y general los cambios que se producen en las articulaciones de pacientes con AR.

Por otra parte, es importante, además, tener en cuenta los factores de pronóstico de la enfermedad ya que su identificación puede ayudar no solo al paciente sino al especialista que podrá conocer mejor el estado en el que se encuentra la patología y poder actuar en consonancia. Actualmente existen diferentes biomarcadores de pronóstico en AR, entre los que destacan el factor reumatoide (autoanticuerpos, generalmente de tipo IgM, dirigidos contra el fragmento Fc de la IgG en suero), los anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado, la presencia de epítipo compartido en HLA-DR β 1, la infiltración de linfocitos, la hiperactividad de macrófagos o la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, entre otros. Trataremos de describir brevemente cada uno de ellos en las próximas páginas.

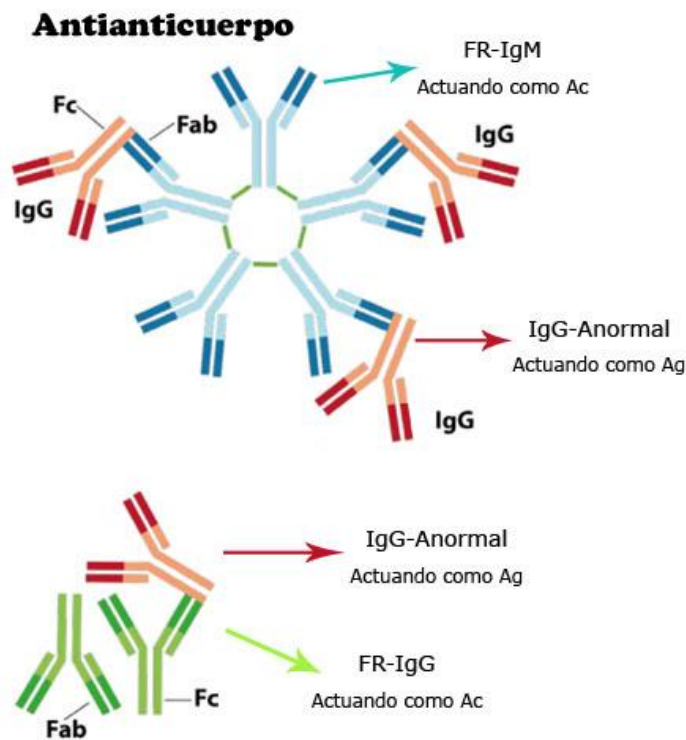
Las pruebas analíticas solicitadas por los especialistas son una buena fuente de información para establecer tanto el diagnóstico como del pronóstico de los pacientes con AR. En dicho informe aparece lo que se conoce como reactantes de fase aguda,

que son aquellas proteínas cuya concentración en sangre varía al menos en un 25% cuando existe un proceso inflamatorio, independientemente de su origen.

Entre estos reactantes de fase aguda podemos destacar los siguientes:

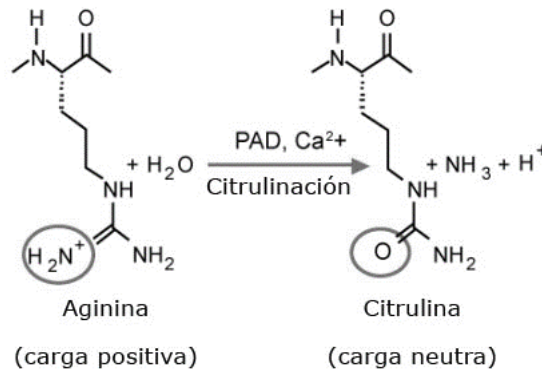
- **Proteína C-reactiva (PCR).** Es un marcador de inflamación en sangre periférica de gran utilidad para el correcto seguimiento y evaluación de la respuesta a los diferentes tratamientos, aunque no es una prueba específica y concluyente. Los estudios descritos en la literatura demuestran que los pacientes que presentan una concentración alta de PCR en sangre durante un periodo largo de tiempo suelen presentar daños articulares más severos [12].
- **Velocidad de sedimentación globular (VSG).** Esta técnica también se realiza en sangre periférica y se mide la tasa de glóbulos rojos que precipitan en una hora [12]. Este parámetro suele estar elevado en personas con proceso inflamatorio o infecciones crónicas, como es el caso de los pacientes con AR.
- **Factor reumatoide (FR).** Es un anticuerpo circulante en sangre que reacciona contra la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG. La región variable de la molécula (zona de contacto y reconocimiento con el agente extraño o patógeno) puede presentar cualquiera de los siguientes isotipos IgM, IgA o IgG (Figura 5). Este marcador está presente en un 75% de los pacientes con AR como consecuencia de la respuesta del sistema inmunitario frente a elementos propios del organismo. Este tipo de autoanticuerpos son generados y liberados por las células B y células plasmáticas, pero su ausencia no garantiza que no se padezca un desorden autoinmunitario [13-15]. Las funciones asociadas con este biomarcador son la unión y procesado de antígenos presentes en inmunocomplejos (ICs), presentación de antígenos a células T en el contexto de las moléculas HLA, amplificación de la respuesta humoral frente a infecciones por bacterias o parásitos y el aclaramiento de ICs circulantes en sangre periférica. En particular, se ha descrito que el FR forma ICs en la membrana sinovial que originan la activación del complemento, el reclutamiento y activación de células B, células T y macrófagos, desencadenado así una respuesta proinflamatoria que originará el daño articular [16]. El FR se encuentra englobado dentro de los factores de pronóstico, porque sus altos niveles se asocian con la perpetuación, agresividad y severidad de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de la enfermedad. Este factor puede ser positivo incluso antes de que surja la enfermedad y, además, puede volverse negativo en el transcurso de esta tras una respuesta favorable al tratamiento.

Figura 5. Isotipos de FR.



- **Anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP o ACPA).** Son unos autoanticuerpos altamente específicos de la AR que se originan cuando el sistema inmunitario genera anticuerpos frente a las proteínas citrulinadas durante los procesos autoinmunológicos e inflamatorios que se producen durante la enfermedad. Por esa razón los anti-CCP se incluyeron entre las pruebas de diagnóstico y pronóstico de la AR [17]. El proceso por el que se generan estos anti-CCP está bien descrito y comienza con la enzima peptidarginil deaminasa (PAD) situada en el citosol que produce una modificación post-translacional de la arginina, dando lugar a la citrulina. Ésta lleva a cabo su función en procesos apoptóticos e inflamatorios, que requiere la movilización de calcio libre (Ca^{2+}) para su actividad [18] (Figura 6). Como en el caso anterior, los anti-CCP pueden preceder a la enfermedad y éstos suelen correlacionarse con la severidad de la misma [19-24], por lo que es un factor tenido muy en cuenta por los facultativos. Los anti-CCP además se detectan en el 40% de los pacientes con FR negativo [25, 26] y aproximadamente el 20% de los pacientes que presentan anti-CCP negativos suelen presentar síntomas menos severos, aunque su fenotipo clínico es indistinguible de aquellos con anti-CCP positivo [27].

Figura 6. Proceso de citrulinación.



- **Anticuerpos antinucleares (ANA).** Son anticuerpos frente al contenido de los núcleos celulares y su título suele encontrarse consideradamente elevado en pacientes diagnosticados con enfermedades autoinmunitarias. Se puede además usar para descartar otro tipo de enfermedades autoinmunes.
- **Líquido sinovial.** El estudio del líquido sinovial es un parámetro clave como factor diagnóstico de la AR, aunque no es específico de esta enfermedad [28]. Para determinar si existe o no inflamación en la membrana sinovial, los especialistas tienen en cuenta los siguientes parámetros: color amarillo opalescente, entre 2.000 y 50.000 leucocitos/mm³, entre 3 y 5 g/dl de proteínas y con un 25% menos de glucosa que en sangre.

Existen además otros biomarcadores serológicos que aportan información sobre la enfermedad como es el caso de los autoanticuerpos de factor antiperinuclear (AFP) [29], los anticuerpos anti-queratina (AKA) [30], los anticuerpos anti-filagrina (AFA), y los anticuerpos anti-vimentina citrulinada (Anti-Sa) [31]. Todos estos autoanticuerpos se caracterizan porque poseen como epítipo el aminoácido citrulina. Sin embargo, la sensibilidad de los pacientes con AR a estos autoanticuerpos es menor que la observada para el FR o los anti-CCP y, por ese motivo, se consideran menos importantes y suelen solicitarse con menos frecuencia para establecer el grado de severidad y agresividad de la enfermedad [32] (Tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidad de diagnóstico de varias pruebas de detención comparando FR y anti-CCP*.

| Biomarcadores | Sensibilidad de diagnóstico (%)* |
|---------------|----------------------------------|
| AFA | 38 |
| AKA | 43-53 |
| Anti-Sa | 43 |
| Anti-CCP | 58 |
| FR | 16 |

Sensibilidad de diagnóstico con una especificidad de la prueba de un 98.5%, en una población de 711 pacientes con AR estable u otras enfermedades reumáticas. *Tabla adaptada de Vincent C et al, 2005 [33].

De los anticuerpos anteriormente mencionados hay que indicar que Anti-Sa está descrito como un autoantígeno importante en tejido sinovial y ha sido asociado con una mayor agresividad y progresión en la erosión de las articulaciones (cartílago y material óseo) [34-37]. En fases tempranas de la enfermedad sus niveles son bajos e incrementan conforme avanza y se cronifica la enfermedad [37, 38].

Los factores de pronóstico engloban una serie de variables tan diversas como edad la del paciente al diagnóstico, los marcadores de predisposición genética, la intensidad y las características con las que se manifiestan los signos y síntomas de la enfermedad, la detección y cuantificación de los diferentes marcadores sanguíneos y la evaluación de las lesiones mediante exploraciones radiológicas, así como el inicio del tratamiento en fases tempranas. Los especialistas suelen revisar estos parámetros para confirmar el diagnóstico de la AR y ayudar a perfilar el pronóstico individualizado. Además, estos factores de pronóstico nos ayudan a evaluar la eficiencia del tratamiento en pacientes con AR [1]. A continuación, indicamos los principales factores de pronóstico que se asocian con la progresión de la enfermedad (Tabla 3).

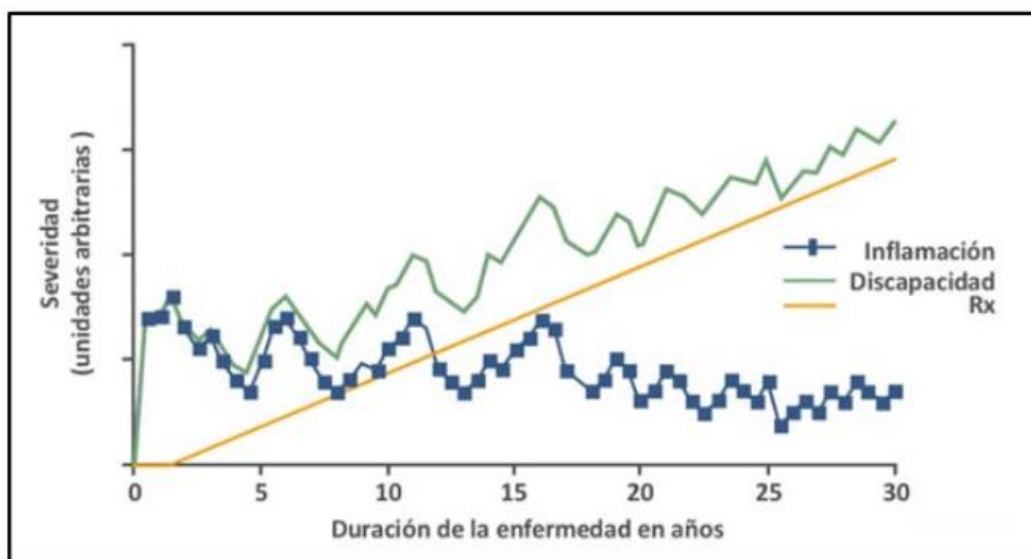
Tabla 3. Biomarcadores que pronostican la severidad de la AR.

| FACTORES PRONÓSTICO DE SEVERIDAD |
|--|
| Inicio de la enfermedad antes de los 40 años de edad (edad avanzada) |
| Afectación de > 20 de articulaciones al inicio de la enfermedad |
| Elevación persistente de la VSG |
| Presencia de marcadores sanguíneos de AR (PCR, FR y Anti-CCP) |
| Presencia de alelos del Epítipo Compartido |
| Desarrollo temprano de erosiones articulares |
| Incapacidad funcional en edades temprana |
| Detección de cambios radiológicos articulares importantes en las fases iniciales |
| Presencia de manifestaciones extraarticulares |

Cuando se manejan pacientes con AR resulta muy complicado tener una evolución clínica clara y exhaustiva, ya que los pacientes suelen presentar una actividad muy fluctuante a lo largo de las diferentes fases por la que transcurre la enfermedad. Sin embargo, el estudio y análisis de los principales factores pronósticos resulta clave para establecer la progresión de la enfermedad y como ésta cursa en cada individuo. Aunque se sabe que la AR es más agresiva en los primeros meses tras el diagnóstico y que después su evolución suele enlentecerse o incluso se detiene, pueden aparecer daños que ya sean graves e irreversibles. El 70% de los pacientes con más de 10 - 12 años de evolución de la enfermedad suele presentar signos de deformación e

incapacidad articular. Kirwan y colaboradores en 1999 [39] realizaron una revisión en la cual analizaron la relación entre los procesos proinflamatorios, lesiones articulares y discapacidad de la AR (Figura 7). En dicho estudio observaron que los procesos inflamatorios disminuían como consecuencia del tratamiento, pero que las lesiones articulares detectadas por métodos radiológicos no descendían al mismo nivel, sino que progresaban y ocasionaban los fenómenos de incapacidad e inhabilitación de los pacientes. Sin embargo, se muestra que la incapacidad del paciente primero está relacionada con procesos proinflamatorios y, conforme se va cronificando la enfermedad, la incapacidad se asocia con daños radiológicos [39].

Figura 7. Curso de la enfermedad, en función de la inflamación articular, lesiones radiológicas e incapacidad.



En esta imagen observamos la progresión de la enfermedad y se muestra que, cuando hay picos proinflamatorios éstos correlacionan con los picos de discapacidad de los pacientes con AR. Ambas líneas se separan porque las lesiones erosivas se mantienen y aumentan en el tiempo, ya que son lesiones que no son reversibles y se agravan con cada nuevo proceso inflamatorio. Imagen seleccionada de Kirwan y colaboradores [39].

1.1.2. Criterios clínicos de la AR.

La asociación americana de reumatología (*The American Rheumatism Association* (ARA)) en 1987 elaboró y estableció unos criterios de clasificación que se siguen usando en la actualidad y que incluyen tanto signos y síntomas clínicos como pruebas biológicas y de imagen que son usadas para el diagnóstico [40] y la progresión de la enfermedad [41].

Esta clasificación se basa en siete puntos, un paciente presenta o es diagnosticado de AR siempre y cuando cumpla al menos cuatro de ellos [40]:

- Rigidez articular matutina (al menos una hora), durante más de seis semanas.
- Inflamación articular (tejidos blandos) con hinchazón palpable de 3 o más grupos articulares simultáneamente durante más de seis semanas. Estas son:

interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos o metatarsfalángicas.

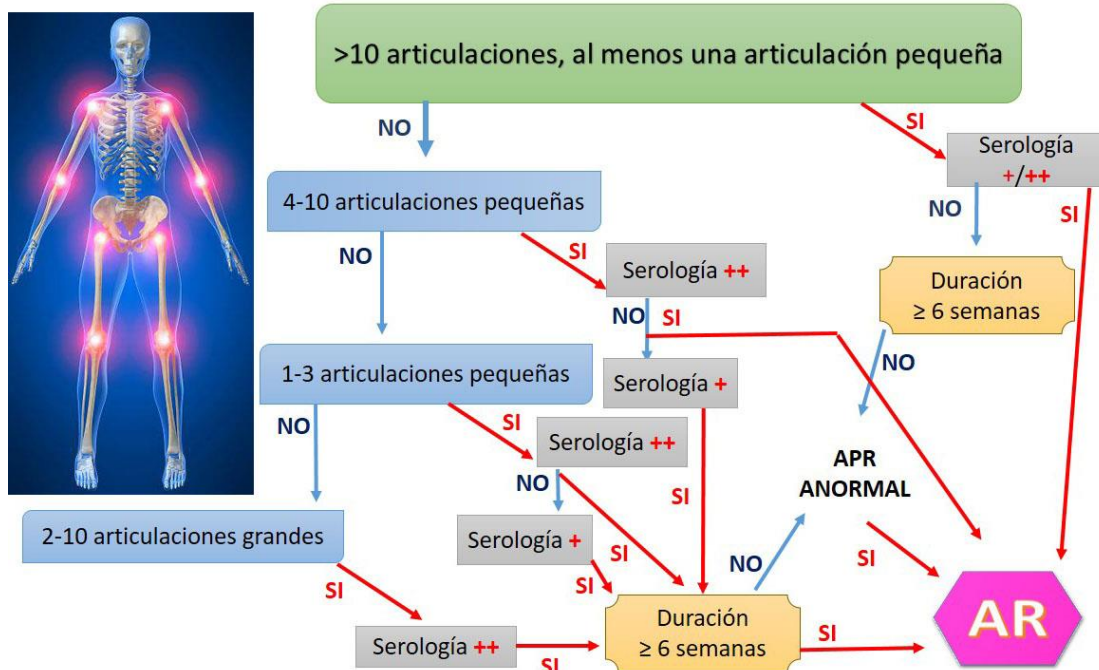
- Sensación general de malestar con cansancio y agotamiento, y al menos un tipo de articulaciones inflamadas (metacarpiana, MCF o IFP) durante más de seis semanas.
- Artritis simétrica. Afectación simultánea de articulaciones en ambos lados del cuerpo, con desviación cubital en ráfagas (los dedos se desvían hacia arriba), deformación en cuello de cisne (la última falange del dedo se desvía hacia abajo) y deformidad en ojal (los nudillos de la IFP se desvían hacia arriba), durante más de seis semanas.
- Presencia de nódulos reumatoides y/o nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficies de extensión o en zonas yuxtaarticulares y nódulos elásticos que crecen en los lados extensores de las articulaciones y en la superficie de algunos tendones.
- Seropositivos para FR en sangre.
- Daño radiológico. Erosión u osteoporosis yuxtaarticular clara y definida en articulaciones afectadas.

Se ha visto que estos criterios son adecuados para pacientes que ya tienen una sintomatología más o menos clara, pero no para aquellos en estadios previos o iniciales de la enfermedad, que son claves para determinar la evolución del paciente [42, 43]. Por este motivo, las dos instituciones más prestigiosas del mundo, el instituto americano de reumatología (ACR, American College of Rheumatology) y la liga europea contra el reumatismo (EULAR, European League Against Rheumatism), se reunieron en 2010 para crear y desarrollar una clasificación unificada de criterios clínicos en la que se incluían a todos los pacientes con inflamación articular y que presentaba enfermedad erosiva articular. De esta manera se unificaron y se aclararon los criterios americanos y europeos, pasando a denominarse criterios para la clasificación del ACR/EULAR de 2010 para AR [44].

Estos criterios se elaboraron para ayudar a los reumatólogos a clasificar los nuevos casos de AR y reubicarlos a su fase correcta de la enfermedad y separarlos en su diagnóstico de otras enfermedades autoinmunitarias con sintomatología similar en las fases iniciales de la enfermedad. Gracias a ese esfuerzo se han identificado y categorizado multitud de nuevos casos en fases más tempranas y así se ha conseguido detener, en muchos casos, la evolución y progresión de la enfermedad evitándose así una mayor destrucción articular y tisular. En estos nuevos criterios se tuvieron en cuenta además los niveles de autoanticuerpos (FR y anti-CCP) que, como ya se ha comentado anteriormente, no son exclusivos de la AR y las pruebas radiológicas para la detección precoz de la deformación y erosión de las articulaciones, o como factor de pronósticos retroactivo de la estabilidad clínica.

Hoy en día, los especialistas usan estos criterios ACR/EULAR 2010 [44], para el diagnóstico clínico y precoz de la AR, porque evalúan el riesgo de cada individuo a desarrollar AR en función de variables clínicas y de laboratorio (Figura 8).

Figura 8. Criterios del ACR/EULAR 2010 para la evaluación del riesgo de AR.



Esquema adaptado de los criterios ACR/EULAR 2010 [44] para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes con AR. Uno o dos (+ o ++) positivos en la serología se refiere a la presencia de FR o/y anti-CCP. La APR (*acute phase response*) está asociada a niveles anormales de otros parámetros detectados en la serología como son la PCR y VSG.

Los criterios ACR/EULAR 2010 nos ayudan a disponer de un estudio más individual y personalizado de los pacientes y nos facilita su agrupación en base a sus características clínicas lo que, a su vez, permite realizar estrategias de tratamiento más individualizadas y adecuadas al cuadro de síntomas que presenta el paciente. Sin embargo, a pesar de la mejora que ha supuesto la llegada de estos criterios todavía no podemos clasificar y diagnosticar al 100% de los pacientes con AR.

Los parámetros que se detallan son:

- Número de articulaciones inflamadas.
- Presencia de autoanticuerpos y análisis de los niveles de PCR o del VSG.

Estos factores, junto con el papel de las erosiones, se consideran clave para valorar la severidad de la enfermedad. Los criterios ACR/EULAR 2010 establecen que para que un paciente pueda ser evaluado debe sufrir sinovitis (inflamación de la membrana sinovial) en al menos una articulación sin un diagnóstico que lo justifique. Una vez que se cumple este requisito se evalúa numéricamente el estado del paciente. Para ello, se analizan cuatro apartados (Tabla 4) valorados con un número según su peso relativo en el riesgo de susceptibilidad. Los valores están comprendidos entre el 1 y el 10, siendo el 6 el número a partir del cual se considera un riesgo alto de padecer AR.

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

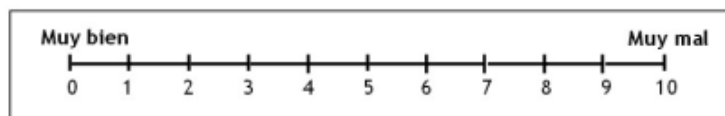
| Articulaciones afectadas | [0-5] | Serología | [0-3] |
|--|-------|--------------------------------------|-------|
| Una articulación grande | 0 | FR y anti-CCP negativo | 0 |
| 2-10 articulaciones grandes | 1 | Valor positivo bajo de FR y anti-CCP | 2 |
| 1-3 articulaciones pequeñas | 2 | Valor positivo alto de FR y anti-CCP | 3 |
| 4-10 articulaciones pequeñas | 3 | | |
| >10 articulaciones afectadas, al menos una pequeña | 5 | | |
| Duración de los síntomas | [0-1] | Evaluación de reactantes de fase | [0-1] |
| < 6 semanas | 0 | PCR y VGS elevada | 1 |
| ≥ 6 semanas | 1 | PCR y VGS normal | 0 |

Los criterios de clasificación para la AR están en continua revisión y modificación ya que es una enfermedad autoinmunitaria multisistémica difícil de diagnosticar porque no todos los pacientes presentan las mismas características y síntomas. Radner y colaboradores en 2014 [45] 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. Concluyeron que los criterios empleados en la actualidad tienen una alta sensibilidad para el diagnóstico de la AR (82%), pero una baja especificidad (61%). Esto se traduce en un alto porcentaje de pacientes sin un diagnóstico claro y temprano [45]. Entre 1 y 2 de cada 5 pacientes fueron erróneamente diagnosticados de AR, lo que sugiere que estos criterios todavía necesitan ser ampliamente testados y validados.

Los reumatólogos para identificar y clasificar a los pacientes con AR se ayudan de los criterios ACR/EULAR y otras herramientas clínicas que indican el estadio y el pronóstico de los pacientes y que incluyen las pruebas clínicas que nos permiten evaluar el grado de la actividad inflamatoria o discapacidad funcional y del daño estructural de las articulaciones en los pacientes, mediante una evaluación detallada del aparato locomotor, reconocimiento de los signos y síntomas y la falta de movilidad, entre otros parámetros.

OMERACT (*Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials*) es una valoración física que se usa desde 1992 y que estudia el dolor que percibe el propio paciente (EGP) durante la revisión clínica. Los valores van de 0 (ausencia de dolor) a 10 (máximo dolor), mediante el uso de EVA (Figura 9).

Figura 9. Escala visual analógica (EVA).



Conjuntamente a esta exploración se determinan los parámetros que miden el grado de actividad inflamatoria, denominados *índices de actividad compuestos* y que son:

- **Recuentos complejos.** Con esta técnica se analizan 68 articulaciones para el dolor y 66 para tumefacción, es unas técnicas que nos aporta mucha información de los pacientes.
- **Puntuación de la actividad de la enfermedad (*Disease Activity Score, (DAS)*).** Como el nombre indica es una puntuación de la actividad de la enfermedad, esto no permite evaluar la actividad inflamatoria de los pacientes, a los cuales se les estudian 44 articulaciones, donde se evalúa ausencia y/o presencia de dolor y/o tumefacción en las articulaciones. Además, se exploran las sensaciones de los pacientes con sus datos analíticos. 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) [46]. En este caso los valores van comprendidos entre 0 a 10. Para calcular el DAS se emplea la siguiente fórmula [47, 48]:

Tabla 5. Fórmula y categorización de la actividad de la enfermedad en función del DAS.

| Fórmula para calcular el DAS | |
|---|--------------------|
| DAS= 0.54(√IR) + 0.065 (NAT44) + 0.33 (lnVSG) + 0.0072 (EGP) | |
| Actividad de la enfermedad | Puntuación del DAS |
| Actividad Baja | DAS<2.4 |
| Actividad Moderada | 2.4<DAS<3.7 |
| Actividad Alta | DAS≥3.7 |

√: 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 paciente.

- **Puntuación de la actividad de la enfermedad - *Disease Activity Score 28 (DAS28)*.** Es una modificación de la técnica anterior, en este caso se analiza como indica el nombre 28 articulaciones dolorosas y entumecidas, esta exploración física es recomendada desde el EULAR para la clasificación de los pacientes con AR [49, 50]. En este caso los valores también van de 0 a 10 y los pacientes se engloban en tres categorías (Tabla 6) [28]. Su fórmula es:

Tabla 6. Fórmula y categorización de la actividad de la enfermedad según el DAS28.

Fórmula para calcular el DAS28
DAS28= 0.54(√NAD28) + 0.28 (√NAT28) + 0.70 (lnVSG) + 0.014 (EGP)

| Actividad de la enfermedad | Puntuación del DAS28 |
|----------------------------|----------------------|
| Actividad Baja | DAS28<3.2 |
| Actividad Moderada | 3.2<DAS28<5.1 |
| Actividad Alta | DAS28≥5.1 |

√: raíz cuadrada.

NAD28: número de articulaciones dolorosas sobre 28 articulaciones.

NAT28: número de articulaciones tumefactas sobre 28 articulaciones.

VSG: Velocidad de Sedimentación Globular.

EGP: Evaluación Global de la enfermedad según paciente.

Los índices de actividad que los especialistas analizan en las exploraciones físicas son de gran utilidad para los estudios científicos, porque son variantes que nos ayudan a discriminar, identificar y clasificar a los pacientes en función de la severidad de la enfermedad y, además, permiten evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos administrados. Estos son pruebas físicas mediante los reumatólogos recogen datos de dolor que suministran los pacientes, pero en la actualidad estas pruebas se complementan con estudios radiológicos o de resonancia magnética (que nos permite visualizar todas las articulaciones afectadas con un rango de error muy pequeño) cuya información es más precisa [51, 52].

1.1.3. Pruebas Diagnóstica de la AR.

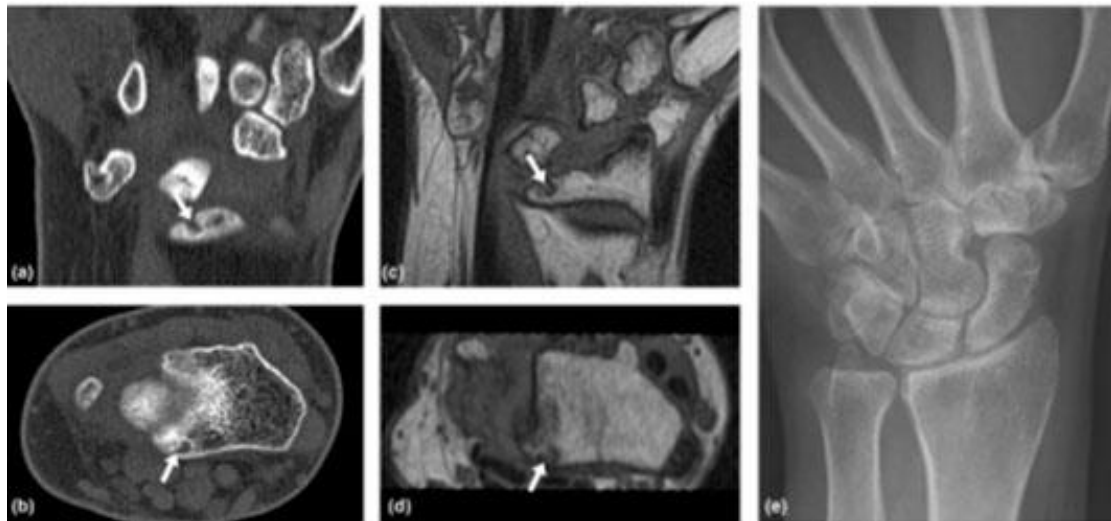
La AR tiene un diagnóstico precoz complicado, ya que los signos y síntomas más característicos de la enfermedad se detectan en etapas avanzadas, cuando ésta se ha cronificado y existe destrucción articular [53]. Por ello, durante las primeras fases o etapas tempranas de la enfermedad, el diagnóstico se establece de una forma diferencial, es decir, por comparación y descarte de los síntomas con otras enfermedades autoinmunes o reumáticas relacionadas. Lo ideal para la diferenciación, determinación y calificación de este desorden autoinmune sería implementar en el protocolo de actuación técnicas de alta sensibilidad como son la ecografía *Power Doppler*, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y el ELISA para la detección de anticuerpos que son capaces de determinar inflamación subclínica o síntomas pocos específicos [54]. Sin embargo, en la actualidad estas técnicas aún no se realizan.

Para un diagnóstico correcto y específico de la enfermedad, el reumatólogo necesita disponer de un amplio abanico de herramientas que incluyen los exámenes físicos de dolor y entumecimiento (para determinar el valor de DAS28), las pruebas analíticas (PCR, FR, velocidad de sedimentación globular y anti-CCP) e imágenes de rayos X o de resonancia magnética de las articulaciones afectadas y la recogida de

datos clínicos en una historia específica para cada paciente [28]. Gracias a esos parámetros clínicos y a ciertos aspectos cotidianos de la vida del paciente se puede establecer de forma fiable el diagnóstico de AR. Los datos registrados además pueden ser utilizados más adelante para determinar el grado de severidad y la progresión de la enfermedad, así como la eficiencia del tratamiento con determinados fármacos. Por otra parte, para el diagnóstico precoz de la AR en la actualidad se están instaurando técnicas radiológicas y de imagen que, hoy en día, aún no se solicitan de forma rutinaria por los especialistas debido a su elevado coste. Sin embargo, el objetivo a largo plazo es que se implante su uso ya que estas técnicas facilitan de forma notable la identificación y caracterización de las enfermedades reumáticas en sus etapas iniciales. Estas técnicas permiten al facultativo visualizar el estado de las articulaciones afectadas y determinar la densidad ósea perdida por eventos proinflamatorios, lo que se traduce en el grado de progresión de la enfermedad. Las pruebas radiológicas se realizan de forma simétrica en las articulaciones superiores e inferiores y todo daño observado se denomina daño radiológico. Estos daños radiológicos pueden surgir y empezar a detectarse en fases muy tempranas de la enfermedad (3 a 6 meses de evolución) aunque en este periodo la mayoría de los pacientes suele ser asintomáticos [55, 56]. Entre las técnicas de diagnóstico la más usada es la radiografía simple que es una prueba inespecífica y poco nítida para el análisis de los segmentos esqueléticos y, como consecuencia, no es una técnica idónea para detectar erosiones en fases precoces de la enfermedad. Por esta razón, se han desarrollado y puesto en práctica otras técnicas de imagen más específicas, sensibles y con una mejor resolución que incrementan la calidad de la imagen obtenida y permiten un mejor análisis de los tejidos blandos y las articulaciones dañadas [57-59]. Entre estas nuevas técnicas destacan: los ultrasonidos, la resonancia magnética (IRM o RNM), y la tomografía por emisión de positrones (PET–tomografía computarizada/IRM) 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 y la eficacia del tratamiento [60].

En la figura 10 y 11 se muestran imágenes obtenidas mediante diferentes técnicas radiológicas y de imagen del daño en diferentes articulaciones. En estas imágenes se observa la diferencia de calidad y nitidez obtenida con las técnicas mencionadas, que, generalmente se traduce, en diferencias en el diagnóstico o identificación de las zonas dañadas y su correspondiente tratamiento.

Figura 10. Imágenes de diagnóstico del daño erosivo provocado por la AR en la articulación de la muñeca.



(a y b) tomografía computarizada; (c y d) T1 resonancia magnética. (e) radiografía.

Figura 11. Imágenes de diagnóstico del daño erosivo provocado por la AR en diversas articulaciones.



Evaluación de los daños en las articulaciones mediante IRM (A-E) y radiografía (F) de la segunda a quinta articulaciones MCP de un paciente con AR. Ilustrando la capacidad de la IRM para visualizar erosiones óseas, osteítis, y sinovitis que no detecta la radiografía. Las flechas indican los diferentes daños en las articulaciones. Imágenes por cortesía de Uffe Møller Døhn, Hospital de Glostrup, Copenhagen (Dinamarca).

En la actualidad, la OMERACT ha concluido que el uso de técnicas radiológicas son básicas para comprender la severidad y progresión de la actividad de la AR y, por ello, se ha aconsejado a los especialistas el uso de resonancias magnéticas para determinar el RAMRIS (*rheumatoid arthritis magnetic resonance imaging score*), un nuevo parámetro que indica el grado de erosión de las articulaciones, el edema óseo y el grado de desgaste de la membrana sinovial [61, 62]. Además del uso de estas técnicas, para el diagnóstico precoz de la AR se utilizan los criterios del ACR/EULAR 2010 [63-66]. Todos estos datos sobre los criterios de diagnóstico son respaldados con múltiples trabajos descritos en la literatura. Entre ellos, cabe destacar el trabajo realizado por

Burgers y colaboradores que realizaron un estudio comparativo de criterios en 1502 pacientes de AR y observaron que 550 casos cumplían los criterios de 1987, 788 pacientes los criterios ACR/EULAR 2010 y 489 estaban incluidos en ambos criterios. En este trabajo se observó que es fundamental la inclusión de pruebas que detecten el daño radiológico para una buena caracterización y diagnóstico del sujeto, estos pacientes que estaban identificados mediante 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 [67]. En línea con este trabajo, estudios posteriores han coincidido en la gran importancia de incluir el daño radiológico entre los criterios de diagnóstico de AR [46, 63]. Finalmente, Rezaei y sus colaboradores (2014) han sugerido que, ante un diagnóstico dudoso, sería importante incorporar a la rutina clínica técnicas de ultrasonidos que facilitaran 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 [46].

1.2. Epidemiología y etiología de la artritis reumatoide.

1.2.1. Incidencia y prevalencia.

La AR es una enfermedad autoinmunitaria crónica, presente en un 1% de la población mundial, España presenta una prevalencia entre el 0.3% y 1.2% [68]. Estos datos obtenidos del trabajo realizado por Carmona, L y colaboradores son confirmado por el estudio EPISER (Estudio de Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española) [69], e indica que la prevalencia de AR en España es del 0.5% y cada año hay una incidencia de 20.000 caso nuevos diagnosticados [70].

El amplio rango que se observa en la prevalencia de la enfermedad es debido a tres puntos principalmente, que son: la identificación, caracterización y diagnóstico de los casos con AR, los diferentes métodos que utilizan los especialistas para definir la enfermedad y como consecuencia de estos dos primeros surge el último que es la inferencia de los resultados. Debido a esto, los datos de prevalencia de la AR que se reflejan se suelen calcular en base a los resultados de incidencia local (es decir, prevalencia relativa donde se calcula un intervalo de confianza con el programa CSAMPLE y se asumen frecuencias relativas) y, a continuación, con esos datos se extrapola a poblaciones mayores (nacionales o mundiales) [68].

La prevalencia de la AR varía ampliamente según la zona geográfica en estudio. 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% [71]. Los nativos americanos originarios de Norte América [72] y los esquimales nativos de Alaska presentan la mayor prevalencia de esta enfermedad, en torno al 7% [73], mientras que las tasas más bajas se han observado en individuos afroamericanos y africanos (0 a 0.42%) [74-76](Tablas 7 y 8) (Figura 12).

Tabla 7. Incidencia y prevalencia de AR en población europea y norteamericana.

| Poblaciones Mundiales | Incidencia (caso/100000 habitantes) | Prevalencia (caso/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 |

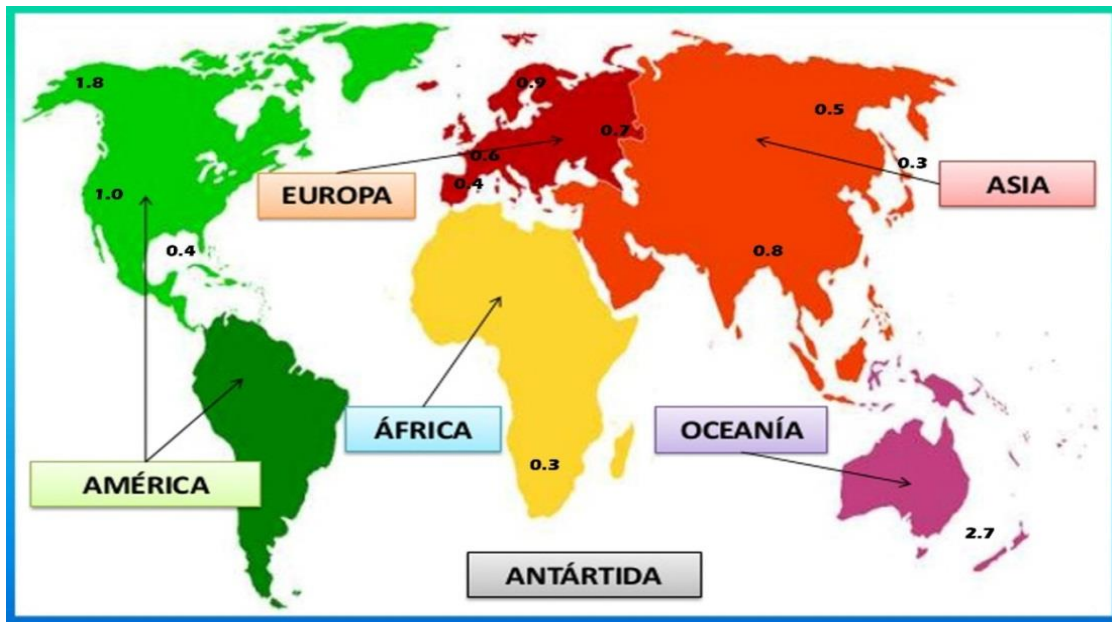
Incidenia y prevalencia con el intervalo de confianza en paréntesis.

Tabla 8. Prevalencia de AR en diferentes regiones del mundo.

| Población | Prevalencia (%) |
|-----------------|-----------------|
| China y Japón | 0.2-0.37 |
| España | 0.3-0.9 |
| Taiwan | 0.9 |
| Ciudad de Cabo | 0.1 |
| Indios Chippewa | 6.8 |
| Esquimales | 7.1 |

Los valores de prevalencia están expresados en tanto por cien.

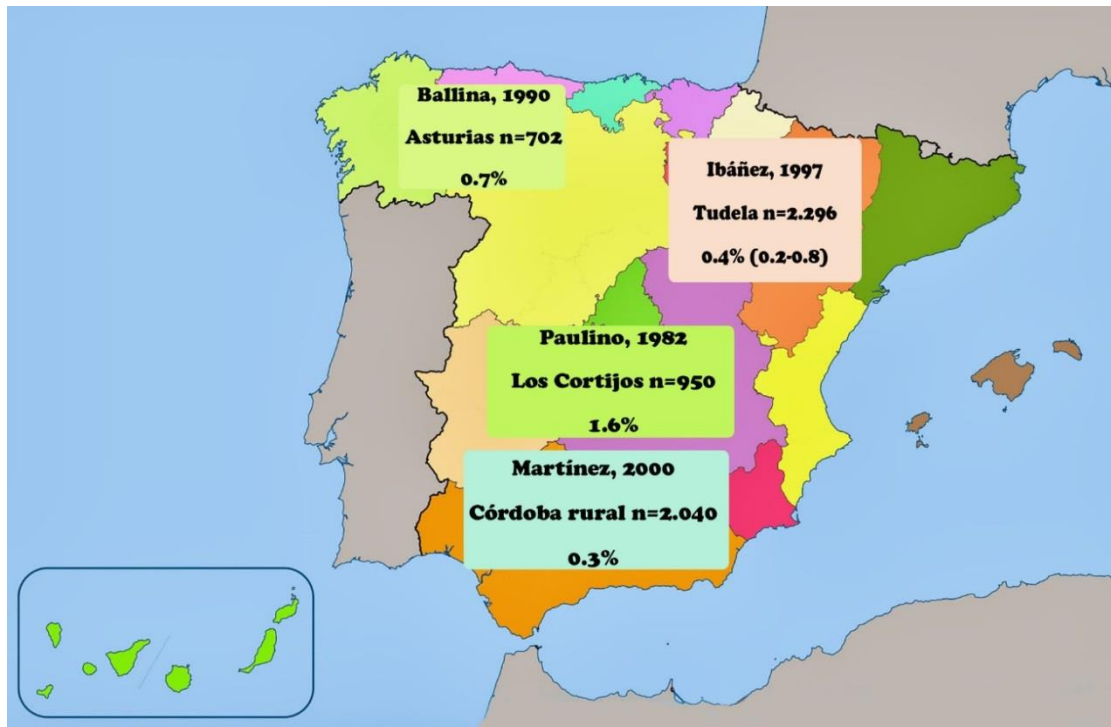
Figura 12. Prevalencia mundial de la artritis reumatoide.



Los datos están expresados en caso por 100 habitantes y es una media de las regiones geográficas.

Entre 1980 y el 2000, cuatro grupos de investigación nacionales realizaron estudios de prevalencia con resultados entre el 0.3% y el 1.6%, como se indicó anteriormente. Estas diferencias se debieron al tamaño muestral del análisis y la definición de los casos. En la Figura 13, se indica donde se realizaron los estudios, los grupos de investigación que los llevaron a cabo y su época y los diferentes resultados de prevalencias en España.

Figura 13. Cuatro estudios de prevalencia de la AR en España.



La prevalencia de la AR en España en los noventa indicándose donde se realizaron los estudios, los grupos de investigación que los llevaron a cabo y el año.

La incidencia asociada a una enfermedad es más complicada de obtener que la prevalencia, porque depende de muchos parámetros e infraestructuras. En España oscila entre 0.2% y 0.4% casos por cada 1.000 habitantes, y a nivel mundial se habla de una 1% [68].

1.2.2. Factores de riesgos de susceptibilidad de la enfermedad.

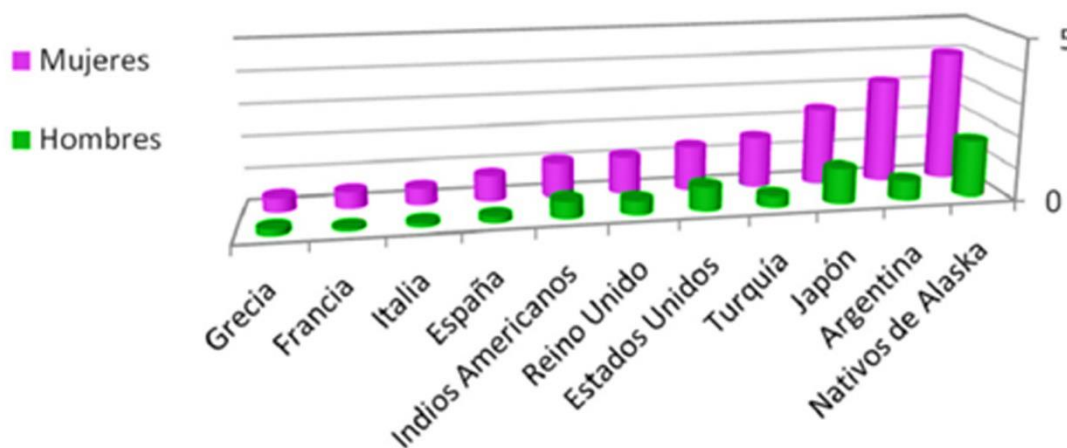
Hoy en día aún faltan muchos aspectos para identificar la etiopatogenia de la AR, pero se conoce que es una enfermedad con carácter multifactorial, esto implica que deben haber diversos factores que interaccionan entre sí para dar origen al desorden, estos son factores hormonales, ambientales [77], genéticos y eventos estocásticos [78]. Además, se postula que también son claves en el origen de la patología otros factores como el estilo de vida del paciente (tabaquismo, infecciones previas) y otros factores intrínsecos de los pacientes como es la exposición a ciertos componentes químicos, edad, género y predisposición genética [79] (Figura 15). Este último factor parece jugar un papel muy relevante en la etiopatogenia de la enfermedad [80].

- **Edad.** La edad de riesgo a desarrollar la enfermedad normalmente está dentro de una franja de edad que comprende de los 45 a los 75 años [81]. La edad del paciente en la que se desencadena el primer evento patológico juega un papel importante para determinar la severidad o progresión de la enfermedad [82]. Esto está plasmado en la literatura y se puede concluir que aquellos pacientes que desarrollan la AR en edades anteriores a los 60 años tiene un mejor pronóstico, con buenas tasas de remisión, y el desorden autoinmunitario es

menos agresivo, que en aquellos casos con edades posteriores a los 60 años donde se ha visto que la enfermedad es más agresiva, provocando una progresión mayor en intervalos de tiempos menores [83-85].

- **Sexo.** En las enfermedades autoinmunitarias (y esta no es diferente) el género juega un papel muy importante en la prevalencia, progresión y severidad de la enfermedad. La incidencia de AR a nivel mundial es mayor en mujeres que en hombres con una ratio hombres/mujeres de 1:3 o incluso 1:4 (Figura 14). Además, los pacientes de género femenino suelen presentar síntomas más severos (incapacitantes), con un menor índice de eficacia del tratamiento y, generalmente, peor pronóstico (peor calidad de vida) que los hombres [86-88] (Figura 14).

Figura 14. Prevalencia de AR en mujeres y hombres, en diferentes poblaciones del mundo.



Diferencias en la prevalencia entre sexos en diferentes regiones a nivel mundial. Esta gráfica se representa en porcentajes (%) y la escala va desde 0 a 5. Las mujeres están representadas con el color morado, mientras en hombres se representan en color verde.

Como anteriormente hemos mencionado la edad de aparición de la enfermedad es determinante y, debido a la diferencia existente de incidencia entre géneros, se han realizado varios estudios que han analizado el comportamiento de la patología en las distintas etapas fisiológicas de la mujer, la edad fértil, el embarazo y la menopausia. Los resultados de estos trabajos concluyeron que los diferentes cambios hormonales que se ven en cada fase fisiológica de la mujer podrían estar relacionadas con la progresión, severidad, evolución y remisión de la enfermedad [89-92]. Por ejemplo, en estudios realizados por Pikwer y colaboradores en 2009 [93] y Karlson y colaboradores en 2004 [94], han observado que en mujeres embarazadas aumentan los niveles de estrógenos, traduciéndose clínicamente en una reducción o remisión de la sintomatología de la enfermedad. El efecto protector de los estrógenos continúa durante la lactancia si las mujeres la prolongan durante más de 12 meses [93, 94]. Dichos resultados se confirman cuando se estudia a mujeres en etapas opuestas, es decir, en etapas menopausicas con bajos niveles hormonales. En esta fase se observa un incremento en el riesgo de desarrollo de la enfermedad y una expresión clínica más

agresiva de la enfermedad [80, 95]. Por otro lado, estos estudios han sido respaldados con trabajos en los que se ha analizado el papel de los anticonceptivos orales. Éstos han demostrado que el uso de anticonceptivos hormonales o cualquier tratamiento hormonal sustitutivo reduce el riesgo a desarrollar esta enfermedad autoinmunitaria [96]. Es por esto, que se propone la implicación de las hormonas esteroideas tanto en la prevalencia como en la evolución de la AR entre hombres y mujeres [96-99].

- **Etnia.** La etnia se ha sugerido como uno de los posibles factores implicados en el riesgo de desarrollar AR. Los resultados obtenidos en los estudios epidemiológicos basados en la prevalencia han encontrado que las poblaciones de indios nativos norteamericanos y tribus de esquimales presentan de cuatro a seis veces más riesgo de desarrollar la enfermedad que la población caucásica europea o los africanos. En estos estudios se tiene muy en cuenta el factor migratorio y el análisis de las nuevas generaciones se condiciona por ese factor, lo que ha permitido demostrar que la aparición de la AR está ligada a factores genéticos y étnicos [100].
- **Estatus socioeconómico.** Algunos estudios han sugerido como factor de riesgo el nivel socioeconómico del individuo (educación, lugar de residencia,...) que puede estar relacionado e intervenir tanto en el diagnóstico como en la severidad, la morbilidad y la mortalidad de la enfermedad [83, 101-103]. Es una consecuencia del desconocimiento de los signos y síntomas de la enfermedad en algunas regiones o la inaccesibilidad a consulta clínicas y, por tanto, la no administración de los tratamientos en tiempos adecuados [104]. Además, el riesgo de desarrollar esta patología se ha visto que está asociada con la práctica de algunos trabajos, por ejemplo, los desarrollados en el sector de la minería debido probablemente a la exposición continuada al polvo de sílice [105, 106].
- **Tabaquismo.** Es un factor que parece jugar un papel importante en el riesgo de desarrollo e inicio de multitud de enfermedades, entre las que se encuentra la AR [107, 108]. Esto se debe a que el humo del tabaco está compuesto por más de 4000 sustancias tóxicas como, por ejemplo, la nicotina, agentes carcinógenos, compuestos orgánicos, solventes, radicales libres y monóxido de carbono. Todos estos compuestos interfieren en el buen funcionamiento y homeostasis del organismo afectando a la respuesta inmunitaria (tanto a nivel humoral como celular), pudiendo tener un efecto tanto proinflamatorio como inmunosupresor. Numerosos trabajos de casos-contróles e investigaciones prospectivas han sugerido que el tabaquismo podría explicar hasta el 25% de los casos de AR [108-121] y que su efecto es dependiente de la dosis [121]. Hoy en día el tabaquismo está catalogado como el principal factor de riesgo ambiental en el desarrollo [122], severidad [5, 123-125] y progresión de la enfermedad [126]. El riesgo asociado al tabaquismo se debe a modificaciones epigenéticas al interaccionar las sustancias nocivas del tabaco con diversos receptores de diferentes genes [127]. Además, las sustancias incluidas en el

tabaco son reconocidas por componentes del sistema inmunitario ocasionando una desregulación de la respuesta inmununitaria que provoca a su vez una síntesis anormal de autoanticuerpos [127, 128]. Los títulos de FR y anti-CCP se encuentran más elevados en pacientes fumadores que no fumadores y, como consecuencia de ello, los individuos fumadores tiene peor pronóstico y una menor eficacia a los diferentes tratamientos [111, 128, 129].

- **Dieta.** Aunque la dieta no parece ser un factor muy relevante en el riesgo a desarrollar AR, algunos estudios han sugerido que algunos alimentos pueden tener un efecto protector al ser ricos en ciertos nutrientes como la vitamina D, los antioxidantes y el hierro (pescado y aceite de oliva). Por otra parte, se han identificado alimentos perjudiciales y que promueven la aparición de la enfermedad como las bebidas alcohólicas, aunque es un tema que aún está en debate [96].
- **Obesidad.** Es un factor de riesgo para AR ya que una persona obesa tiene mal regulados ciertos parámetros inmunológicos (niveles de PCR y citocinas proinflamatorias como el TNF α y la IL6) que parecen estar relacionados con el origen y severidad de la enfermedad [130-132].
- **Estrés.** Es un parámetro que favorece el riesgo a desarrollar AR y que, además, parece repercutir negativamente en el curso de la enfermedad [133, 134]. Se sabe que los pacientes en situaciones de estrés presentan un peor pronóstico y una peor respuesta terapéutica que, en ocasiones, se traduce en el desencadenamiento de afectaciones extraarticulares, especialmente las relacionadas con el sistema cardiovascular [135].
- **Infecciones previas.** La información que hay en la literatura sobre el papel de las infecciones en el desarrollo de la AR es controvertida. En 1974 se inició una iniciativa promovida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la ACR para identificar los diferentes agentes infecciosos que podrían participar en el desarrollo de la AR. Entre ellos destacaron ciertos virus tales como *virus de Epstein-Barr*, *parvovirus* y *retrovirus* y bacterias como *Proteus mirabilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Porphyromonas gingivalis* que producen infecciones agudas [184-190]. Algunos de estos patógenos como algunas micobacterias y hongos (*Neisseria gonorrhoea*, *Borrelia burgdorferi*, *Dracunculus medinensis*) fueron detectados mayormente en pacientes con AR crónica ya que promueven el daño articular por su invasión y colonización [136]. Se ha propuesto que los agentes infecciosos pueden jugar un papel importante porque son capaces de presentar secuencias peptídicas idénticas a los autoanticuerpos que desencadena la respuesta autoinmunitaria. Este fenómeno se conoce como *mimetismo molecular* y se presenta en casos de infección por el virus de *Epstein Barr* o bacterias como *Brucella ovis* y *Lactobacillus lactis* [137]. Además del mimetismo molecular, algunos de estos microorganismos (los estafilococos, por ejemplo) presentan otros mecanismos

a través de los cuales desencadenan la respuesta inmunológica como son los superantígenos (moléculas que activan a linfocitos T independientemente del MHC), o la activación de las proteínas de choque térmico (HSPs) y el daño oxidativo [138, 139].

Figura 15. Factores que contribuyen al inicio de la AR.



Se ha sugerido la existencia de otros factores de riesgo como los factores ambientales que junto con los factores hormonales y genéticos podrían conducir al desarrollo de la patología [80]. Sin embargo, a pesar de la creencia general, no existen evidencias científicas que relacionen el riesgo de la enfermedad con factores como, por ejemplo, el clima [83]. La EULAR ha descrito cuales son los principales factores de riesgo que deben tener en cuenta los especialistas para identificar a la hora de diseñar estrategias de prevención de la enfermedad reumática [140]:

- ✓ Factores genéticos [86, 117, 141, 142].
- ✓ Presencia de FR y anticuerpos anti-CCP [80].
- ✓ Síntomas de inflamación articular sin evidencias clínicas de sinovitis [143, 144].
- ✓ Sinovitis sin evidencia clínica de AR [144-146].
- ✓ Síntomas clínicos similares a la AR, pero no suficientes ni relevantes para poder confirmar el diagnóstico de la enfermedad [147].

2. Fisiopatología de la AR.

En la actualidad se desconocen la mayoría de los mecanismos que desencadena la AR. Sin embargo, sí se conocen cuáles son los principales signos y síntomas que presentan los pacientes con AR que están relacionados con una respuesta proinflamatoria exacerbada. Esta enfermedad autoinmunitaria es compleja y

multifactorial, es decir, tanto su origen como su progresión y severidad están sujetos a la influencia de múltiples factores que interactúan entre sí. Los reumatólogos detectan el desorden por cambios simétricos en las articulaciones. Estos cambios macroscópicos se deben a modificaciones en el revestimiento de las articulaciones cuando se inflaman como consecuencia de una hiperplasia sinovial y por la proliferación, activación y reclutamiento de células inmunológicas en las zonas afectadas. La membrana sinovial de los pacientes con AR se encuentra infiltrada por células inflamatorias tales como fibroblastos, macrófagos, mastocitos, linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), células NK (natural killers), y células plasmáticas. Este fenómeno proinflamatorio invade tejidos adyacentes, como los cartílagos, tendones y ligamentos ocasionados al daño articular y, finalmente, daño óseo.

Por otro lado, el desarrollo de la AR se ha asociado a procesos de angiogénesis. La angiogénesis es un proceso dinámico a través del cual se forman nuevos capilares a partir de vasos ya existentes [148-151]. En la AR, se ha observado que existe una desregulación en los procesos de angiogénesis que, por motivos de la infiltración y el reclutamiento exacerbado de células y moléculas mediadoras de procesos proinflamatorios, desencadena la progresión de la enfermedad [148, 151-153].

Debido a los incesantes estudios desarrollados en las últimas décadas para el conocimiento de los diferentes factores implicados en el riesgo de desarrollar AR, se han identificado diversos factores etiopatológicos con un papel muy importante. Entre estos factores implicados en la etiopatología de la AR encontramos los genes MHC y no MHC, los linajes celulares, los receptores celulares, las moléculas de adhesión y las citocinas y quimiocinas cuya interacción desencadena el riesgo a desarrollar la patología. Para un mejor conocimiento de la patogénesis de la AR se ha intentado recrear la enfermedad fundamentalmente en modelos murinos en los que por diferentes procedimientos técnicos se ha inducido poliartritis. Este proceso también se conoce como fenómeno de inmunización mediante la inyección de moléculas como la ovoalbúmina o el suero de albumina bovina o el polisacárido peptidilglicano (PGPS), entre otros [154]. Esta estrategia permite observar los cambios genéticos, moleculares, fenotípicos y morfológicos producidos durante el inicio de la enfermedad y las diferentes etapas de progresión [155].

Los pacientes con AR muestran cambios histológicos localizados en la membrana sinovial de las articulaciones que consisten a grandes rasgos, en una angiogénesis pronunciada, una hiperplasia celular y la infiltración de leucocitos inflamatorios, así como cambios en las moléculas de adhesión en la superficie celular, la liberación de proteinquinas y abundantes citocinas proinflamatorias. Como consecuencia de estos eventos que se dan en la membrana sinovial, ésta se vuelve hiperplásica, dando lugar a fenómenos de infiltración sobre todo de linfocitos T y B, macrófagos y células plasmáticas [1]. Entre los cambios histológicos más frecuentes en la AR temprana encontramos las lesiones microvasculares y el aumento del revestimiento de células sinoviales. A simple vista cuando el especialista observa la membrana sinovial detecta

una membrana más gruesa, inflamada y con aspecto edematoso, algodonoso y plegado. El aspecto a nivel microscópico en estos pacientes son estructuras similares al órgano linfoide y con lesiones en los capilares. Las etapas que definen esta nueva morfología patológica son dos, la fase inicial y la fase consolidada:

- **Fase inicial.** Durante esta fase el tejido tiene un aspecto inflamado como consecuencia de los depósitos de células plasmáticas y fibrina. Estos depósitos de exudados, con infiltración celular (la primeras en llegar al foco son células polimorfonucleares (PMNs), la cuales tiene una papel primordial en el reclutamiento de linfocitos T y B y células plasmáticas) y estrechamiento vascular, provocan que la membrana vaya desarrollando un aspecto edematoso [156]. Cuando los especialistas visualizan la membrana sinovial de pacientes sanos observan que la membrana está formada por entre 1 y 3 capas, mientras que en pacientes con AR ese número de capas aumenta hasta llegar a tener entre 6 y 9. Debido a todos estos procesos de reclutamiento celular y fenómenos proinflamatorios en el sinovio se desencadena un endurecimiento de la pared y una hemorragia perivascular que da lugar a la formación de pequeños focos de necrosis.
- **Fase consolidada.** En esta fase se consolidan todos esos procesos de reclutamiento celular y procesos proinflamatorios provocando un aumento del número de capas celulares en las membranas sinoviales [157] junto con procesos de proliferación e hipertrofia que dan lugar a la aparición de microvellosidades que son conocidas a nivel clínico como pannus [158]. Los pannus se caracterizan porque están asociados con el daño en el cartílago y tejidos anexos (tendones, ligamentos y hueso) que terminan liberando enzimas lisosomales como las proteasas ácidas y neutras, las colagenasas y las enzimas proteolíticas. Al final de esta fase se produce fibrosis y anquilosis dando lugar a deformaciones e inmovilidad articular que determinan la progresión y la severidad de la enfermedad.

El paso por estas fases explica el aspecto final granuloso de la membrana sinovial patológica compuesta fundamentalmente por fibroblastos y células inflamatorias que proliferan en un entorno pro-angiogénico. Todo esto se traduce en daño articular y la incapacidad de los pacientes con AR.

3. Inmunología de la AR.

Los síntomas clínicos observados en la AR se deben en su mayoría a fenómenos proinflamatorios que se originan en una o varias articulaciones sinoviales y que se traducen en daño articular, degradación y pérdida de la membrana sinovial además del material cartilaginoso y óseo. Es por tanto esencial caracterizar la respuesta inmunológica y conocer las diferentes células y moléculas implicadas que actúan a múltiples niveles (Figura 16). El sistema inmunitario responde de manera diferente en función del patógeno, antígeno o sustancia extraña detectada para su neutralización y

posterior eliminación. En pacientes con AR se ha descrito que el sistema inmunológico está íntimamente ligado con diferentes alteraciones, las cuales juegan un papel muy relevante en el inicio de la patología y condicionan la progresión y severidad de la misma.

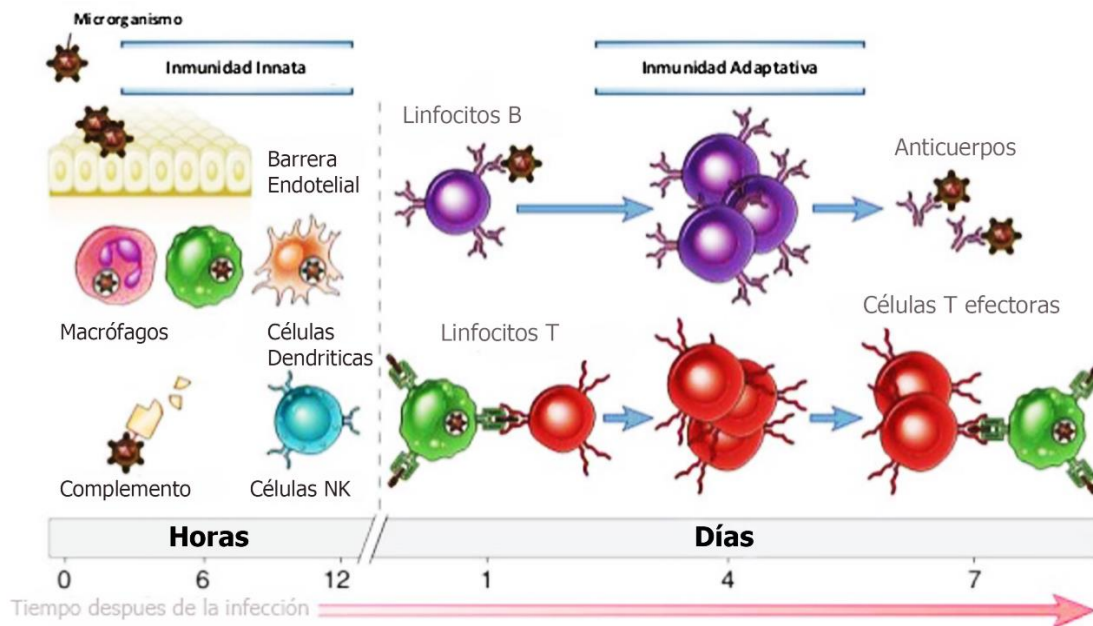
En primer lugar, nos encontramos con la respuesta inmunitaria innata, que está dirigida por los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas, los neutrófilos, los mastocitos, los eosinófilos y las células NK. La respuesta innata constituye la primera línea de acción y, por ello, es una respuesta rápida, inespecífica y genérica frente a microorganismos comunes (bacterias y virus) o antígenos que están en el ambiente y que consiguen atravesar la primera defensa física. Estos tipos celulares tienen la función de detectar y actuar rápido frente a los agentes extraños para una eficiente eliminación. Por otro lado, nos encontramos con la respuesta inmunitaria adaptativa que es una respuesta más elaborada y específica y que necesita más tiempo para su desarrollo [159]. En este caso participan un mayor número de tipos celulares como son las células Th1, Th2, Th17, células B y células plasmáticas [160-162] (Figura 17) además del sistema del complemento que conducen a la activación de condrocitos y la liberación de múltiples citocinas y quimiocinas proinflamatorias entre otros factores [3, 163]. Asimismo, es necesario mencionar que este tipo de respuesta adaptativa genera células de memoria lo que conduce a una respuesta más eficaz, agresiva y rápida cuando el sistema inmunitario se encuentra de nuevo con ese mismo antígeno o molécula patógena.

El sistema inmunitario juega un papel central en la AR y su desregulación provoca un fallo en el reconocimiento de componentes propios que son identificados como extraños dando lugar a la generación de autoanticuerpos. Este desajuste en la regulación de la respuesta inmunológica es clave y está descrito como uno de los factores más relevantes en el origen de la enfermedad y en su progresión, así como en determinar la eficacia de la respuesta a diferentes fármacos en los pacientes con AR. Por ello, en los estudios desarrollados en esta tesis los autoanticuerpos FR y anti-CCP han tenido siempre una consideración especial.

En este apartado intentaremos describir las diferentes células inmunitarias que participan en la regulación del sistema inmunológico, pero, además, conocer cuál es el papel de cada uno de estos tipos celulares en los diversos procesos inflamatorios que determinan la aparición de la enfermedad.

Figura 16. Respuesta inmunitaria Innata y adaptativa.

Respuesta inmunitaria Innata y Adaptativa



En esta figura se representa cómo evoluciona la respuesta inmunitaria a lo largo del tiempo (hora y días) y que tipos celulares intervienen en cada momento.

3.1. Macrófagos.

Los macrófagos derivan a partir de monocitos de la médula ósea que emigran hasta el tejido conjuntivo donde se lleva a cabo su diferenciación. Los macrófagos son células mononucleares con capacidad fagocítica y su principal función es la de actuar como células presentadoras de antígeno y liberar citocinas y quimiocinas que estimulen la eliminación de tejido dañado manteniendo así la homeostasis tisular y eviten la presencia de patógenos. La actividad fagocítica se lleva a cabo en un contexto proinflamatorio local que, en la mayoría de los casos, pasa desapercibido para el individuo que lo padece. Cuando estudiamos el comportamiento de este tipo celular en pacientes con AR se observa que presenta una actividad exacerbada en la membrana sinovial de las articulaciones, generando grandes cantidades de cartílago-*pannus* que está estrechamente ligada con la progresión y severidad de la enfermedad [164]. Como consecuencia del importante papel que tienen los macrófagos en el desarrollo y progresión de la enfermedad, estas células se han identificado como una posible diana terapéutica y, en la actualidad, diferentes líneas de investigación se encuentran en desarrollo [165, 166].

Existen dos tipos de macrófagos de acuerdo con su función biológica, los macrófagos tipo 1 (M1) que son activados por la vía clásica y dan lugar a reacciones inflamatorias y los macrófagos tipo 2 (M2) de la vía alternativa que tienen funciones inmunosupresoras y de reparación de tejidos dañados. En pacientes con AR predomina el tipo M1 [167, 168] lo que desencadena un proceso proinflamatorio mediado por

citocinas y quimiocinas como el $TNF\alpha$, las interleucinas 1, 6, 12, 23 y las ROS [169]. Al mismo tiempo, los macrófagos tipo M1 pueden desempeñar otras funciones entre las que destacan su diferenciación a células dendríticas (DCs) que tienen una mayor afinidad por los linfocitos Th0 y provocan su diferenciación a células Th1/Th17 que son fundamentales en la patogenia de la enfermedad. Asimismo, los M1 pueden activarse de forma directa a través del complemento o indirecta por receptores Fc en la membrana sinovial liberando citocinas ($TNF\alpha$, IL1 e IL6), quimiocinas (MCP1) y factores de crecimiento (GM-CSF) entre otros mediadores, lo que se traduce en la aparición de erosiones articulares en tejidos y huesos, un daño que suele ser irreversible en los pacientes con AR [164]. El origen y consolidación de los focos inflamatorios está ocasionado por un desbalance entre los macrófagos M1 y M2 que también se ha observado en pacientes con anti-CCP [170].

3.2. Células dendríticas.

Las células dendríticas (DCs del acrónimo inglés *Dendritic Cells*) fueron descubiertas por Paul Langerhans y colaboradores en 1868. Se les atribuyó ese nombre por la forma ramificada en forma de estrella o neurona que presentan en su fase madura. Las DCs son células inmunitarias especializadas y profesionales en la presentación y fagocitosis de antígenos y, debido a su función, se encuentran en mayor número en las mucosas de diferentes tejidos (piel, nariz, pulmón, pulmones e intestino). Las DCs son esenciales en la respuesta innata y adaptativa, ya que tienen la capacidad de reconocer antígenos o patrones moleculares propios y extraños a través de receptores de membrana como los receptores toll (TLRs) o las lectinas tipo C y, una vez en su interior, procesarlos y externalizarlos en su membrana para ejercer su función como células presentadoras de antígenos profesionales (APC). Las DCs pueden ser activadas por diferentes tipos celulares entre los que se encuentran los fibroblastos, los linfocitos T o B y las células epiteliales [171] ocasionado la activación y proliferación de las mismas e iniciando la respuesta inmunitaria. Las DCs llevan a cabo su función de APC mediante moléculas co-estimuladoras bien conocidas. Entre ellas destacan el CD80, el CD86 y el CD40, pero además receptores de quimiocinas como el CXCR4 y el CCR7 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del tipo II (péptido-MHC-II o MHC-II) [172]. En la AR, las DCs ejercen su papel de APC en tejidos sinoviales donde llevan a cabo la diferenciación de las células Th0 a células Th1/Th17 maduras, promoviendo así la activación de rutas inflamatorias como, por ejemplo, la vía del $NF\kappa B$, una ruta fundamental y clave en procesos proinflamatorios ya que determina la activación de factores de transcripción que participan en la activación de células T y en los procesos de osteoclastogénesis [172].

En base a su procedencia las DCs pueden clasificarse en DCs mieloides (mDCs), que fueron las primeras en ser caracterizadas y, por ello, también se denominan DCs convencionales y las DCs plasmaticitoides (pDCs) o las derivadas de monocitos (moDCs) [172, 173]. Las dos primeras (mDCs y pDCs) tienen un origen común y el resto

proviene de monocitos (CD14⁺) que se encuentran en abundancia en zonas inflamadas [172]. Asimismo, sabemos que estos subtipos son capaces de mantener el foco proinflamatorio y perpetuar la inflamación en pacientes con AR. Segura, E y colaboradores en 2013 demostraron que uno de los tipos celulares más abundantes en los tejidos articulares inflamados son las mo-DCs que se asocian con la estimulación de linfocitos T CD4⁺ de memoria y la liberación de IL17 mediada por células Th17 [174]. Entre las investigaciones con DCs destaca el uso de DCs tolerogénicas que tratan de regenerar, restaurar y normalizar la respuesta inmunológica [172] y se ha visto que mejoran la sintomatología clínica global de los pacientes.

3.3. Monocitos.

Los monocitos son glóbulos blancos agranulocíticos que, junto con los macrófagos tisulares, forman el sistema fagocítico mononuclear. Este tipo celular se caracteriza por ser el de mayor tamaño y por su núcleo arrañonado. Los monocitos circulan en sangre durante aproximadamente 8 horas y, a continuación, pasan al tejido donde se diferencian a macrófagos. En el contexto de la AR, los monocitos activados se encuentran abundantemente en las articulaciones inflamadas donde producen un estímulo inflamatorio local e intervienen en la liberación de las distintas citocinas proinflamatorias como la IL1 β , la IL6 o el TNF α . Esto genera un foco inflamatorio que estimula la respuesta inmunitaria y promueve la aparición de erosiones [175, 176]. El subtipo más común en sangre periféricas de pacientes con AR son los monocitos CD14^{bright}/CD16⁺ que tienen la capacidad de activar la diferenciación de las células Th0 a células Th17 favoreciendo así los procesos inflamatorios. Si la diferenciación de los monocitos tiene lugar en el hueso se denominan osteoclastos que favorecen la reabsorción del hueso y que, por ello, son células esenciales en la aparición, mantenimiento y regulación de erosiones articulares y/u óseas en AR [177]. Este tipo celular secreta principalmente TNF α , una de las citocinas proinflamatorias más importantes en AR y que, en la actualidad, constituye una de las dianas terapéuticas más empleadas para el control de la enfermedad [178].

3.4. Neutrófilos.

Los neutrófilos son las células PMNs más abundantes en sangre constituyendo un 60-70%, su morfología es granulocítica y su principal función es la de fagocitar microorganismos (bacterias y hongos). En procesos inmunitarios o inflamatorios estas células son las primeras en llegar al foco inflamatorio atraídas por citocinas o quimiocinas como la IL8 y el IFN γ y, una vez allí, ejercen su actividad citotóxica a través de la liberación de enzimas líticas y degradadoras como la elastasa, la gelatinasa, la lactoferrina, la mieloperoxidasa y la colagenasa entre otras que se encargan de modular la interacción célula-célula [179]. A su vez, los neutrófilos tienen la capacidad de liberar gran cantidad de citocinas con funciones activadoras y reguladoras de células T, células B, DCs, células NKTs y macrófagos, gracias a la expresión de receptores de membrana del tipo MHC-II. En circunstancias patológicas, este tipo celular se caracteriza por la secreción de proteasas, ROS y TNF α que inducen los primeros daños

articulares y tisulares en los pacientes con AR. Además, durante este proceso proinflamatorio los neutrófilos son los responsables de la secreción y liberación de las citocinas RANKL y BAFF que son moléculas clave en la activación de células B y procesos de osteoclastogénesis [180]. Por otra parte, los neutrófilos expresan receptores Fc que tienen diferentes afinidades por los ICs e intervienen en el mantenimiento y quimioatracción de diferentes moléculas en la membrana sinovial inflamada [181, 182]. Estudios recientes, incluidos los que forman parte de esta tesis, han demostrado que la presencia de ciertos polimorfismos en los diferentes isotipos de las fracciones Fc ocasionan un cambio en la afinidad de estos receptores por los ICs y, de ese modo, determinan la respuesta inflamatoria y el grado de progresión y severidad de la enfermedad [183].

3.5. Basófilos.

Los basófilos son los leucocitos menos abundantes en sangre periférica y presentan un núcleo irregular y granulado. Su principal función es intervenir en procesos alérgicos, aunque también se ha observado que actúan en procesos inmunitarios induciendo la repuesta Th2, en detrimento de la vía Th1, mediante la activación de citocinas antiinflamatorias (IL4, IL13 y linfopoyetina estromal tímica). Considerando sus características fundamentales sería lógico pensar que los basófilos puedan tener poca o ninguna relevancia en la AR. Sin embargo, se ha descrito que los basófilos migran a los nódulos linfáticos interaccionando con linfocitos B estimulando así la producción y liberación de autoanticuerpos e ICs, moléculas clave para el desarrollo de la enfermedad. Lo que sí parece confirmarse es que no interfieren en la progresión y severidad de la respuesta autoinmunitaria ya que desaparecen en las fases crónicas de la enfermedad [184, 185].

3.6. Mastocitos.

Los mastocitos son células inmunitarias primitivas de linaje mieloide del tejido conectivo que se originan en la médula ósea, y se localizan en la mayoría de los tejidos donde sintetizan y almacenan histamina y heparina. Constituyen el nexo entre la respuesta inmunológica innata y adaptativa y se activan interaccionando con otras células del sistema inmunitario liberando el contenido de sus gránulos y favoreciendo los procesos inflamatorios. En AR, los mastocitos, además, liberan mediadores de la inflamación tales como la IL1 β , el TNF α y el RANKL, moléculas fundamentales tanto para iniciar como para mantener procesos inflamatorios [186]. Los mastocitos además inducen la expresión y activación de enzimas metaloproteinasas (MMP) y colágenasas encargadas de destruir la matriz [187] y su presencia se ha relacionado con mal pronóstico o la falta de respuesta frente a fármacos.

3.7. Osteoblastos y osteoclastos.

Los osteoblastos y los osteoclastos son células diferenciadas que solo se encuentran en tejido óseo, estos tipos celulares están especializados en la renovación y remodelación del hueso. El funcionamiento normal de las estructuras óseas se alcanza

mediante el equilibrio y la homeostasis entre los osteoblastos (células encargadas de sintetizar matriz ósea) y los osteoclastos (especializados en la degradación, reabsorción y remodelación del hueso). Durante la enfermedad este equilibrio se rompe y se incrementan los procesos osteoclásticos que se traducen en la destrucción del material óseo cercano al sinovio inflamado y en la progresión de la enfermedad [188]. Estos fenómenos son la consecuencia de la acción de las células Th1 y los fibroblastos sinoviales que liberan citocinas como RANKL y GM-CSF encargadas de la diferenciación y activación de células precursoras de los osteoclastos. Además, la acción de estas citocinas se ve incrementada por el TNF α , la IL1 e la IL17 o citocinas Th2 como la IL4, la IL10, el GM-CSF y el IFN γ que inhiben el buen funcionamiento de los osteoblastos en pacientes con AR [189, 190].

3.8. Condrocitos.

Los condrocitos son las células más características del cartílago ya que son las encargadas de producir colágeno y proteoglucanos para el mantenimiento de la matriz. Son las células encargadas del mantenimiento y funcionamiento de la compleja red cartilaginosa que se forma para la protección del tejido óseo. Los condrocitos actúan en respuesta a ciertos mediadores proinflamatorios, hormonas y algunos factores de crecimiento. En la AR, los condrocitos son atacados y destruidos progresivamente por células T y NK lo que conlleva la pérdida de la integridad y consistencia de la matriz del cartílago.

3.9. Fibroblastos.

Los fibroblastos esta ubicado en tejido conectivo, y su morfología general es muy característica son células alargadas (fusiforme), con un núcleo pequeño. Aunque su morfología puede variar o ser heterogénea dependiendo de su localización tisular, este tipo celular tiene la capacidad de sintetizar fibras de colágeno y glucosaminoglucanos teniendo un papel relevante en el mantenimiento y regulación de la matriz extracelular. Los fibroblastos migran a las zonas dañadas y ayudan a la homeostasis y regeneración del tejido conectivo mediante la cicatrización y reparación de las lesiones [191, 192]. En los pacientes con AR, los fibroblastos se encuentran sobre todo formando una fina capa dentro del tejido sinovial y se conocen como "*fibroblast-like synoviocytes*" (FLS). Estas células migran al tejido y líquido sinovial de las articulaciones donde destruyen el material cartilaginosa y óseo y participan en la generación de los procesos inflamatorios [193]. Se ha descrito que los fibroblastos reaccionan en respuesta a diferentes citocinas como el TNF α dando lugar a la liberación de una gran variedad de mediadores inflamatorios que desencadenan la destrucción articular y ósea. Asimismo, este tipo celular desencadena la degradación y destrucción del cartílago y tejido óseo de las articulaciones mediante la producción y secreción de diversas moléculas como son MMP y catepsinas, que colaboran sinérgicamente con otras moléculas como RANKL y DKK1 (Dickkopf-1) y expresión de quimiocinas (CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL5 y CXCL1), promoviendo la activación de los osteoclastos favoreciendo la progresión del daño articular [194].

3.10. Linfocitos T.

Los linfocitos T juegan un papel fundamental en la autoinmunidad interviniendo en las distintas fases inflamatorias de la AR y se encuentran en gran número en la membrana sinovial inflamada [195, 196]. Los linfocitos T llevan a cabo su función proinflamatoria mediante la activación de TCR por las APCs situadas en la membrana sinovial y, una vez activados, proliferan y liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias al foco inflamatorio del tejido sinovial de las articulaciones lo que estimula la reacción inflamatoria [3].

Los linfocitos T son células pleiotrópicas [197], es decir, actúan en base al Ag que le presenten las APCs determinando diferentes tipos de respuestas inmunológicas [198]. En la AR, los linfocitos T junto con los linfocitos B juegan un papel clave en la producción de autoanticuerpos específicos (FR y anti-CCP entre otras moléculas) que llegan al torrente sanguíneo formando lo que se conoce como ICs que precipitan y se depositan en las membranas y tejidos sinoviales ocasionando una respuesta inmunitaria proinflamatoria adicional y exacerbada [199].

3.10.1. Linfocitos T cooperadores o células T helper (células T CD4⁺).

Los linfocitos T colaboradores (Th) son un subtipo especializado de los linfocitos T que se caracterizan por presentar en su membrana proteínas de superficie CD4⁺ en su etapa madura. Las células T tienen un papel central en la activación e inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa debido a su capacidad de activar y dirigir la respuesta inmunitaria y distintos procesos inflamatorios. Son, por ejemplo, los encargados de ayudar a la formación de anticuerpos mediante linfocitos B e inducir la activación y la proliferación de los linfocitos T citotóxicos incrementando la actividad bactericida de células fagocíticas como los macrófagos. Estos linfocitos retienen o recuerdan al antígeno original y si el patógeno o parte de él es reconocido de nuevo actúan de modo más rápido y efectivo.

Los linfocitos Th interactúan con las APCs lo que provoca la activación y diferenciación de los linfocitos Th a tres tipos células Th1, Th2 y Th17 que dan lugar a tres vías de señalización. En primer lugar, cuando las células Th0 se diferencian a Th1 se desencadena una respuesta inflamatoria muy bien orquestada y altamente efectiva [200]. La respuesta Th1 es clave en la AR ya que activan y reclutan células proinflamatorias como los macrófagos que inducen la liberación de citocinas esenciales en la perpetuación de la inflamación como el INF γ e IL2 [201]. En el caso de que se active la ruta Th17, los resultados son similares aunque la activación de la respuesta inmunitaria está dirigida por las citoquinas IL17 e IL22 [202, 203]. Por último, en el caso que las células T CD4⁺ se diferencien hacia la vía Th2 (debido a la interacción con linfocitos T o B y mastocitos) se secretan citocinas antiinflamatorias como la IL4, la IL5 y la IL13 [201]. La vía de señalización Th1/Th17 juegan un papel clave en la cronificación de la AR [204] ya que desencadenan procesos inflamatorios mediados por macrófagos y, además, activan la diferenciación de osteoclastos y condrocitos por medio del TNF α , la IL1 y la IL17 promoviendo la degradación y destrucción del tejido articular y óseo. La respuesta mediada por células Th2 también es relevante ya que

inhibe la activación de los osteoblastos y reduce los procesos inflamatorios en la membrana sinovial [205].

3.10.2. Linfocitos T citotóxicos (Células T CD8⁺).

Las células T citotóxicas son las encargadas de neutralizar y eliminar a los microorganismos intracelulares mediante un ataque directo uniéndose al antígeno e inyectando y secretando enzimas líticas como la perforina o las granzimas provocando su destrucción por mecanismo de apoptosis, actuando mediante la vía FasL/Fas. Este tipo se distingue del anterior porque en su etapa madura las proteínas de superficie son CD8⁺. La implicación de este tipo celular en la patogénesis de la enfermedad es controvertido. Carvalheiro y colaboradores en 2013 [206] sugirieron que los linfocitos T CD8⁺ son responsables de los infiltrados inflamatorios difusos y de los centros germinales que se producen en el sinovio y que son necesarios para el mantenimiento y la progresión de la AR [206]. Los linfocitos T CD8⁺ debido a su función citotóxica pueden intervenir en la degradación de la matriz del cartílago y materia ósea y, además, son activadores y mediadores de la muerte celular de los condrocitos.

3.10.3. Linfocitos T reguladores (células Treg).

Las células Treg son un subtipo de las células T que suprimen la activación de la respuesta inmunitaria, ayudando y favoreciendo la homeostasis y tolerancia hacia a los diferentes autoantígenos. Este subtipo celular de linfocitos T se caracteriza porque expresa en la superficie celular los marcadores CD4 y CD25. Las células Treg pueden modular su papel de regulación y modulación de la respuesta inmunitaria (vía Th1, Th17, y presentación APCs) de forma directa mediante el contacto célula-célula, o de manera indirecta por medio de la liberación de citocinas (IL10 o TGFβ), o incluso a través de la actividad citotóxica de los linfocitos T autorreactivos [207]. En pacientes con AR, los niveles de linfocitos Treg son bajos lo que se atribuye al microambiente proinflamatorio que existe en la membrana sinovial y debido a la gran producción de citocinas y quimiocinas de carácter inflamatorio. Una de las principales funciones de las células Treg durante la AR es la de controlar y prevenir la acumulación de células B autorreactivas que son *a posteriori* causantes, al menos en parte, de la progresión y severidad de la enfermedad [208, 209].

3.10.4. Las células “natural killer” (Células NK).

Las células NK juegan un papel clave en la respuesta inmunitaria innata, gracias a su gran capacidad fagocítica reconociendo a los antígenos, eliminándolos a través del ataque de su membrana plasmática causando lisis celular. Para ejecutar su funciones fisiológicas y moleculares presentan una amplia gama de receptores en su membrana, los cuales pueden ser activados por dímeros CD94 y NKG2C, NKG2D o NKG2E o en contra posición inhibidos por KIRs, CD94/NKG2A, LIR-1/ILT2. El sinovio articular de los pacientes con AR se caracteriza por tener gran cantidad de células NKT CD56^{bright} que secretan citocinas proinflamatorias como el TNFα o el IFNγ que desencadenan la función citotóxica dependiente de anticuerpo y activación de monocitos o fibroblastos que liberan IL12, IL15, e IL18. Todo este ambiente colabora a la maduración de DCs y

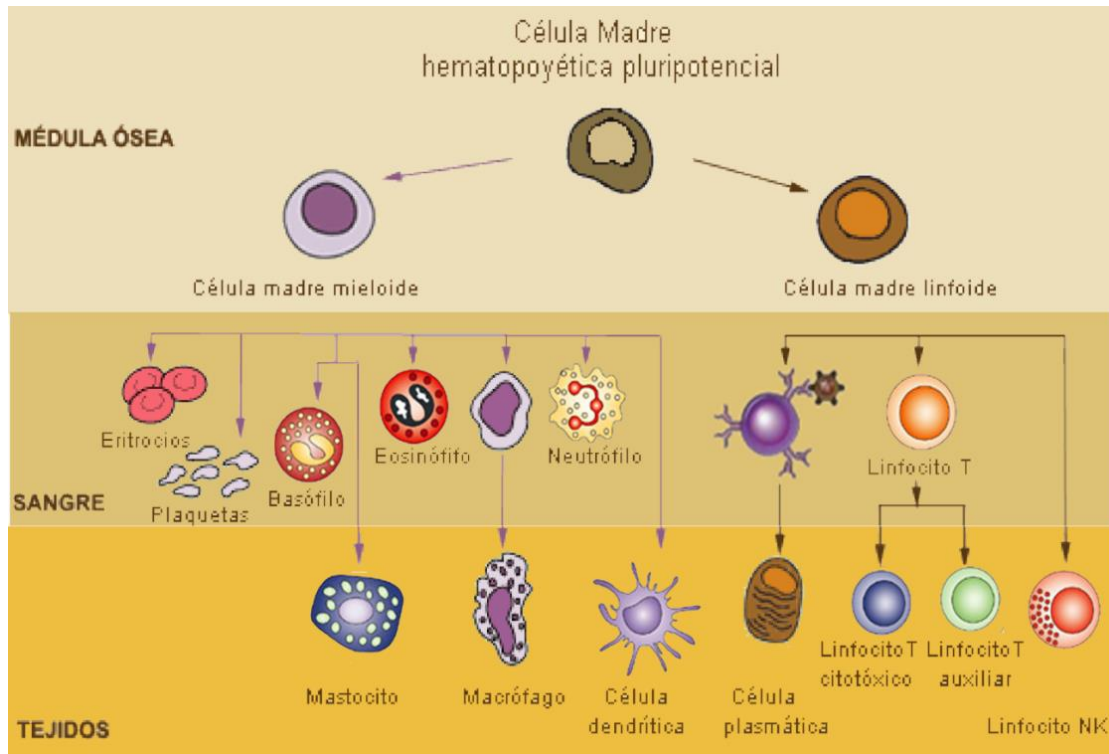
su acción citotóxica estimulando a los linfocitos B y T por medio de moléculas co-estimuladoras como CD40, OX40, CD70 y CD86 [210]. Simultáneamente, los linfocitos NKT en AR están implicados en la osteoclastogénesis a través de las citocinas RANKL y M-CSF que protegen eliminando linfocitos T citotóxicos autorreactivos [199, 210, 211].

3.11. Linfocitos B.

Los linfocitos B son esenciales en la respuesta inmunitaria porque son células capaces de sintetizar anticuerpos frente múltiples antígenos. Además, los linfocitos B presentan en su membrana el receptor denominado BCR que puede ser activado directa o indirectamente por APCs y células T. Este tipo celular es clave porque cuando las células B son activadas proliferan y se diferencian a células plasmáticas y células de memoria. En la AR, los linfocitos B tienen un papel clave por su excesiva reactividad y por su característica desregulación del reconocimiento y procesamiento de Ag propios y extraños por medio de la vía BCR/TLRs [212-214]. Es por ello, por lo que han sido identificados como potenciales dianas terapéuticas [215].

Durante la AR, los linfocitos B migran hacia el foco inflamatorio activándose y generando autoanticuerpos específicos que forman ICs que se depositan y acumulan en las membranas sinoviales y articulares provocando un aumento exacerbado de la respuesta inflamatoria por activación directa (ruta del complemento y linfocitos T) o indirecta (mediante receptores de la familia Fc que son capaces de activar a macrófagos y células NK). Una vez que los linfocitos B son activados en el foco inflamatorio se van a generar y secretar citocinas proinflamatorias como el TNF α y la IL1 e IL6. Las células B, además, tienen la capacidad de liberar otras citocinas como la IL17 implicada en la del daño tisular y erosión ósea en los pacientes con AR. Otro papel importante que tienen los linfocitos B en la AR es su función de producción de autoanticuerpos como el FR [216] y anti-CCP [217] que influyen en la progresión y severidad de la enfermedad y en la respuesta a fármacos [216, 218, 219].

Figura 17. Esquemas de los distintos tipos celulares del sistema inmunitario y su localización de acción.



En esta figura se representa como se originan los diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales.

3.12. Citocinas y quimiocinas relevantes en la AR.

La AR es una enfermedad autoinmunitaria crónica por este motivo citocinas y quimiocinas tales como $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, y IL-17 entre otras, tiene un papel relevante en los procesos inflamatorios que desatan la activación de diferentes rutas, que son las encargadas de desencadenar, regular y originar una respuesta en las diferentes etapas y progresión de la enfermedad (Tabla 9). Además, estas proteínas trabajan conjuntamente con otras moléculas metaloproteasas (MMP) y enzimas interviniendo también en la integridad de tejido cartilaginosa y óseo [220].

Las citocinas y quimiocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular con una vida media corta y que son producidas por células inmunitarias. Son liberadas por las células del sistema inmunitario de muchos tejidos y juegan un papel esencial en la mediación y transmisión de señales intracelulares [221]. Las citocinas son las responsables de dar lugar a los síntomas clínicos típicos observados en los pacientes de AR. Sabemos además que determinados factores ambientales o el estrés pueden favorecer este desequilibrio desencadenando brotes inflamatorios.

Las citocinas y quimiocinas más notables en la AR se pueden clasificar en dos grandes grupos según su función:

3.12.1. Citocinas y quimiocinas proinflamatorias en la AR.

Las principales citocinas con efecto proinflamatorio en la AR son: IL1 α/β , TNF α/β , GM-CSF, IL4, IL6, IL12 (p70/p40), INF γ , IL15, IL17, IL18, IL21, IL22, IL23, IL8 (CXCL8), RANK/RANKL, CXCL13 y BAFF (Figura 18). Entre todas ellas las principales citocinas son IL1 α/β que intervienen en la destrucción del cartílago y en la erosión del hueso a través de la activación de osteoclastos, condrocitos y moléculas de adhesión a células epiteliales y fibroblastos [190, 222-225]. La IL1 β actúa sinérgicamente con el TNF α y en algunos pacientes se recomienda el uso de anakinra que es un antagonista específico del Receptor de la IL1 (IL1R), ya que se ha demostrado que reduce la aparición de erosiones [226, 227]. Otra de las citocinas proinflamatorias destacadas en la enfermedad es el TNF α al que se atribuye un papel central en el inicio y la perpetuación del daño articular y la destrucción del hueso. El TNF α activa a otra citocinas y multitud de células inmunitarias con las que opera sinérgicamente en el foco inflamatorio [228-230].

Entre las citocinas más influyentes en la determinación de la respuesta inmunitaria en AR también debemos mencionar la IL6 que interviene tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad y está íntimamente relacionada con la destrucción articular y la erosión ósea mediada por RANKL y VEGF [224, 231-233]. Estas 3 citocinas están además implicadas en la diferenciación de los monocitos a macrófagos M1 y osteoclastos, dos tipos celulares claves en la perpetuación de la inflamación en los tejidos sinoviales y responsables de la deformación y destrucción del material articular y óseo [234]. Asimismo, estas citocinas intervienen en la maduración y activación de los linfocitos B y la producción de autoanticuerpos [235] que termina en la activación de la vía Th17. En esta vía la citocina clave es la IL17 que junto con la IL1, la IL6, la IL23 y el TFG β , actúan en fases avanzadas de la enfermedad provocando la liberación de multitud de citocinas y quimiocinas que interaccionan y activan macrófagos y otras células inmunitarias que intervienen en procesos proinflamatorios y en la osteoclastogénesis [236, 237]. Además, se ha descrito que en este contexto el TNF α está implicado en la propagación y perpetuación de la inflamación ya que activa y recluta FLS, macrófagos, monocitos, células T y B [238, 239]. El GM-CSF es otra citocina fundamental ya que está encargada de la regulación, diferenciación y activación del linaje de células mieloides. Es secretada principalmente por linfocitos T y macrófagos e induce la supervivencia de las células Th17 [240] y, por tanto, facilita el mantenimiento de la inflamación articular. Además, en presencia de RANKL es capaz de estimular la producción de osteoclastos acentuando el daño articular [241].

En la vía Th1 las principales citocinas que intervienen son el INF γ y la IL2. En el caso particular del INF γ está localizado en la membrana sinovial e induce la diferenciación de macrófagos inflamatorios tipo M1. Por otro lado, la IL2 es una citocina con efecto pleiotrópico. En las células Th1 promueve el desarrollo y supervivencia de las células T mientras que cuando actúa sobre la vía Th17 induce la producción de IL17 colaborando en la perpetuación de la inflamación de la membrana sinovial [224, 242]. Además de

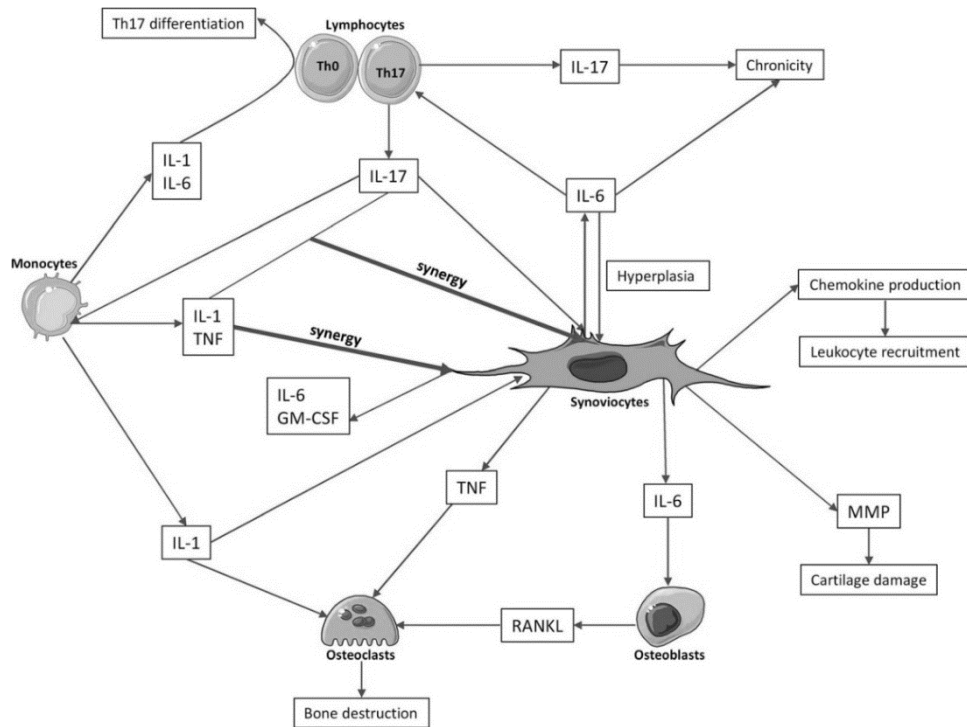
estas citocinas, en el microambiente del foco proinflamatorio se secretan otras citocinas y quimiocinas proinflamatorias que ayudan a mantener la inflamación. Un ejemplo lo constituye la IL12 (p70/p40) que interviene en la diferenciación de las células Th1 a través de la estimulación de la producción de IFN γ y la citotoxicidad celular dependiente de la activación y proliferación de linfocitos T CD8 $^+$ y las células NK [225]. Además del IFN γ existen otros tipos de interferones que participan en la activación de las células mieloides [243]. Todos ellos están implicados en procesos proinflamatorios por lo que se han sugerido también como posibles dianas terapéuticas y marcadores de pronóstico [225].

Aunque teóricamente menos características, existen otras citocinas que merecen ser mencionadas en el contexto de la AR. Entre ellas podemos señalar a la IL15, la IL18, la IL21, la IL22 y la IL33 o quimiocinas como la IL8 o la CXCL13. La IL15 promueve la interacción entre los linfocitos T y macrófagos [244] mientras que la IL18, que pertenece a la familia de la IL1, actúa estimulando la producción de IFN γ y trabaja sinérgicamente con la IL12 y la IL15 para inducir la diferenciación de las células Th1 a través de la activación de las células T citotóxicas y las células NK [221]. Por otra parte, la IL21 induce la vía Th17 y la producción IL6 mientras que la IL22, que pertenece a la superfamilia de las IL10 [245], activa los linfocitos T CD8 $^+$ y células NK [246]. La IL23 (p19) es producida por DCs y macrófagos en respuesta a diversas citocinas [204] y fomenta la activación de la respuesta Th17 y la perpetuación del proceso inflamatorio y daño tisular [221, 247]. La IL33 es una citocina que pertenece a la familia de las IL1 y se localiza en el citoplasma y actúa activando monocitos y FLS [228]. Finalmente, entre las quimiocinas más significativas destacamos la IL8 y la CXCL13. Mientras que la IL8 está implicada en la fase aguda y participa en el reclutamiento y activación de neutrófilos a la membrana sinovial [248], la CXCL13 está relacionada con atracción de los linfocitos B y T al foco inflamatorio [249, 250]. En este mismo bloque de citocinas proinflamatorias podríamos mencionar el BAFF que es producido por los macrófagos, monocitos y células dendríticas desempeñando un papel clave en la supervivencia, maduración y activación de las células B a través de su interacción con sus receptores TACI, BAFF-R y BCMA [251, 252]. Se ha visto que el BAFF también participa en la activación de los linfocitos T [253] y células T efectoras [254-256] por lo que se ha sugerido también como un posible marcador terapéutico en la AR [257].

En resumen, se puede concluir que las citocinas proinflamatorias más importantes en la enfermedad son el TNF α y la IL1 β que actúan en la perpetuación de la inflamación crónica en AR [258] a través de la activación de fibroblastos sinoviales y condrocitos [259]. Estas citocinas han sido las primeras dianas terapéuticas frente a la enfermedad [258, 260], pero recientemente se ha visto que otras combinaciones de fármacos pueden tener un efecto positivo en el control de la enfermedad. En particular, la combinación de fármacos frente a TNF α e IL17 ha demostrado ser eficaz para producir una disminución de la inflamación articular y del daño tisular [261] con menos efectos adversos. Sin embargo estos estudios son aún limitados y se necesita investigar más

en profundidad los beneficios de su uso [262]. En el caso de la citocina GM-CSF, se ha utilizado un antagonista denominado *mavrilimumab* cuya eficacia parece ser similar a la observada por los fármacos que bloquean la vía del TNF α [263].

Figura 18. Interacción entre las citocinas proinflamatorias y los distintos tipos celulares en la patogénesis de la AR.



En esta figura se describe esquemáticamente como intervienen y actúan las diferentes citocinas proinflamatorias en los distintos tipos celulares del sistema inmunitario en la fisiología y patogénesis de la AR. Figura adaptada de [231].

3.12.2. Citocinas con efecto antiinflamatorio en AR.

Entre las citocinas antiinflamatorias más destacadas en AR encontramos la IL4, la IL13, la IL25, la IL27, y la IL35 [264]. La IL1Ra es una citocina producida principalmente por monocitos y que antagoniza con la IL1 compitiendo por el receptor. Por ese motivo se ha propuesto como diana terapéutica [265]. La IL4 está implicada en la diferenciación de las células Th2 inhibiendo la producción de las principales citocinas proinflamatorias como el TNF α , la IL1 β o la IL6 [232]. Además, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que la IL4 reduce la reabsorción del hueso a través de su acción sobre los osteoclastos y la producción de MMP [232]. Por otra parte, aunque la IL27 se ha asociado con la activación de la vía Th1, también se ha observado que induce la producción de IL10 [221]. Finalmente, la IL35 que es producida por células Treg induce la liberación de IL10 [221].

Tabla 9. Resumen de las citocinas más relevantes en la patogénesis de la AR y su contexto celular e inmunológico.

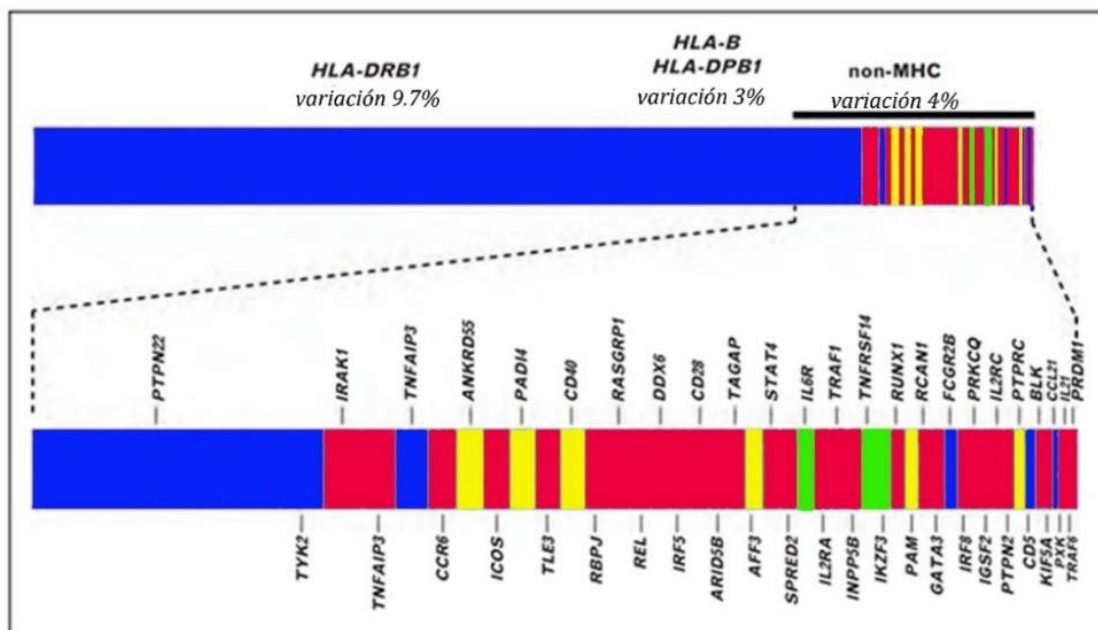
| | | | |
|-------------|---|--|--|
| Th1 | IFN γ , IL12 | IL2, IL12, IL18, IL27, IFN γ | Respuesta inflamatoria |
| | | | Activación de macrófagos y neutrófilos |
| | | | Inhibición de la proliferación de la vía Th2 |
| Th2 | IL2, IL4, IL31, IL33 | IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13 | Estimulación de las células B y proliferación y diferenciación a células plasmáticas y producción de autoanticuerpos |
| | | | Inhibición de la proliferación de la vía Th1 |
| Th17 | TGF β , IL1 β , IL6, IL21, IL23 | IL17, IL21, IL22, IL26, GM-CSF, TNF α | Respuesta inflamatoria |

4. Genética de la AR.

Estudios genéticos en casos familiares de AR [266, 267] y gemelos monocigóticos [268-270] han demostrado la importancia de la genética en la susceptibilidad de la AR, así como en determinar la evolución de la enfermedad. MacGregor y colaboradores observaron que la heredabilidad atribuida a la genética estaba en torno al 60% y que el 40% restante podía explicarse por la presencia de factores ambientales y otros procesos estocásticos [268, 271]. En la actualidad se ha llegado a la conclusión de que el riesgo a desarrollar la enfermedad se debe a la interacción entre factores genéticos y factores ambientales. En este apartado nos vamos a centrar en describir los factores genéticos implicados tanto en la determinación del riesgo a desarrollar la enfermedad como en la modulación de la progresión y la respuesta terapéutica.

La región del genoma que presenta una mayor asociación con el riesgo a desarrollar AR es la región *HLA*. Sin embargo, aunque la implicación del *HLA* es indiscutible, esta región no explica todo el componente genético en AR. Estudios desarrollados en las últimas décadas en el campo de la genética han permitido identificar otras regiones *no HLA* del genoma que tienen un papel importante en la etiopatogenia de la AR (Figura 19). Un estudio reciente y que engloba los datos genéticos masivos producidos durante estas décadas de estudios es el desarrollado por Okada y colaboradores (2014) en el que estudiaron 10 millones de variantes e identificaron variantes genéticas en 100 locus *no HLA* que estaban significativamente asociados con el riesgo a desarrollar AR [272]. Entre ellos cabe destacar genes como *PTPN22*, *CTLA4*, *PADI4*, *TNF α IP3* o *STAT4* que explican en torno al 5.5% del componente genético de la AR [272-278].

Figura 19. Esquema de la heredabilidad atribuida a los loci asociados con AR en población europea.



Se representan en azul las señales con fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) que codifican para proteínas; en amarillo son variantes con fuerte LD en cis-eQTLs presente en PBMCs; los SNPs en verde son regiones con fuerte LD en cis-eQTLs en PBMCs que codifican para proteína. El tamaño de cada caja representa la variación del fenotipo explicado por cada *Locus* [279]

4.1. Historia y evolución de la genética en la AR.

Entre 1976 y 1978 Peter Stastny, gracias a una mezcla de leucocitos cultivados y técnicas de serología, identificó el primer gen implicado con el riesgo a desarrollar AR [280], el HLA-DRB1 que en aquella época se conocía como *HLA-DRw4* [199]. Este gen tiene un papel central en la modulación del riesgo a desarrollar la enfermedad y su identificación supuso el inicio de para la identificación de otro subtipos del mismo gen que dio lugar a la teoría del “epítipo compartido” de Gregersen, y colaboradores en 1987 [281]. El epítipo compartido consiste en una secuencia de 5 aminoácidos (QRRAA, QKRAAA o RRRAAA) en las posiciones 70-74 de la cadena *DRB1* que está fuertemente asociada con el riesgo y severidad de la AR [280-283]. En la actualidad la región *HLA-DRB1* sigue siendo la más representativa del componente genético de la AR, pero se han identificado, sobre todo a partir del 2007 con la llegada de los GWAS, un gran número de nuevas variantes genéticas asociadas con el desarrollo de esta enfermedad autoinmunitaria.

La llegada de estas nuevas tecnologías en áreas como la genética y la genómica ha mejorado sustancialmente el conocimiento de las bases genéticas de la AR. Los GWAS nos han permitido estudiar las variantes genéticas comunes distribuidas a lo largo de todo el genoma de un individuo [272, 284] y los *arrays* de última generación lo hacen a un coste bastante asumible. Los GWAS han identificado múltiples regiones, rutas y genes implicados en la patología de la AR entre las que se incluyen la región 22q12 o genes como *TNFSF4*, *IRAK1*, *REL*, *CD28*, *TYK2*, *LBH*, *EOMES*, *ETS1-FLI1*, *COG6*, *RAD51B*,

UBASH3A, *SYNGR1* y *TNF α IP3* [284-286]. Además, los GWAS han conseguido confirmar o descartar asociaciones previamente sugeridas en estudios de genes candidato y hasta la fecha se han identificado de forma consistente más de un centenar de genes asociados con el riesgo de desarrollar la enfermedad [272, 287].

Las variantes descritas en la literatura se localizan en su gran mayoría en áreas no codificantes dentro del genoma (90%). Sin embargo, a pesar de ello, sabemos que muchos de los SNPs identificados tienen función biológica conocida. Estas funciones son específicas y afectan a procesos como a la expresión génica (eQTLs, *expression quantitative trait loci*), el *splicing* o la unión a microRNAs o factores de transcripción (*enhancers*), histonas e incluso la metilación [285, 288]. Farh y colaboradores en 2015 demostraron que sólo un 10 o 20% de las variantes asociadas con AR afectaban a sitios de unión para factores de transcripción, un 60% eran *enhancers* y hasta un 90% se ubicaban en regiones no codificantes del genoma [285, 289]. Es frecuente observar que los SNPs pueden actuar como un eQTL afectando a la expresión de otros *loci* cercanos [290, 291] lo que ha permitido conocer el papel de ciertos genes en la etiopatogenia de la enfermedad y los mecanismos que determinan la respuesta a diversos tratamientos [286, 289, 292, 293].

4.2. Mapeo genético por estudios de desequilibrio de ligamiento.

El objetivo de estos estudios ha sido identificar qué genes se heredan de forma conjunta [294, 295] y determinar su papel en AR a través de análisis de co-segregación en casos familiares. Una vez localizadas dichas regiones cromosómicas, estos análisis se confirman mediante mapeo genético y de análisis de asociación para poder identificar los diferentes SNPs relacionados con el desarrollo de AR. Finalmente, estas variantes son genotipadas en diferentes poblaciones mundiales y se realizan análisis funcionales para ver el posible papel biológico que las variantes genéticas desempeñan [296-301]. A través de estos estudios se identificaron los principales genes de la región HLA. Hoy en día están en desuso por su bajo poder estadístico, alta heterogeneidad fenotípica y la inconsistencia de los resultados obtenidos [302].

4.3. Estudios de genes candidato.

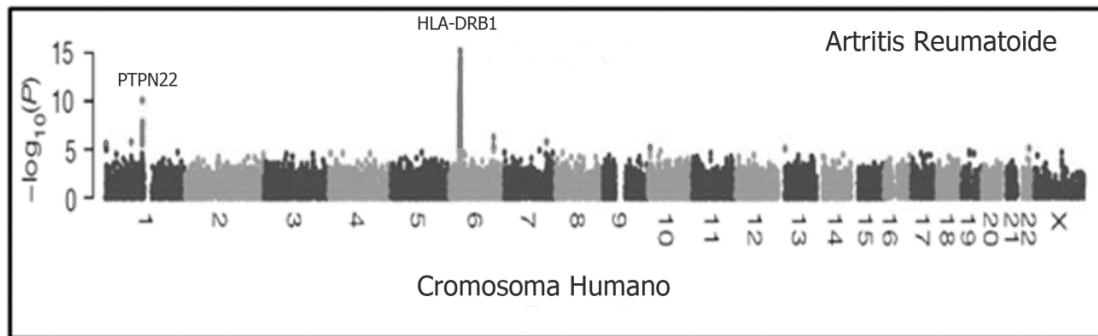
Este tipo de estudios se basa en una hipótesis biológica previa que posibilita la sección de los genes de interés. Una vez seleccionados los genes se escogen los SNPs para el análisis de asociación. Esta selección puede depender de múltiples parámetros como la función biológica que desempeñan o el desequilibrio de unión, que nos permiten seleccionar las variantes que explican toda la variabilidad del gen escogido. Este tipo de estudios han demostrado ser de enorme utilidad para la identificación de biomarcadores de susceptibilidad a enfermedades o incluso parámetros como la progresión, supervivencia e incluso respuesta terapéutica. No obstante, estos estudios también presentan algunos inconvenientes, como la necesidad de grandes poblaciones de pacientes y la falta de reproducibilidad. Por este motivo es frecuente que se diseñen

trabajos de replicación en poblaciones independientes [303]. En la actualidad, este tipo de estudios se siguen realizando ya que han demostrado ser útiles en el pasado para la identificación de biomarcadores asociados con el riesgo a desarrollar AR [304-306].

4.4. Estudio de asociación de genoma completo.

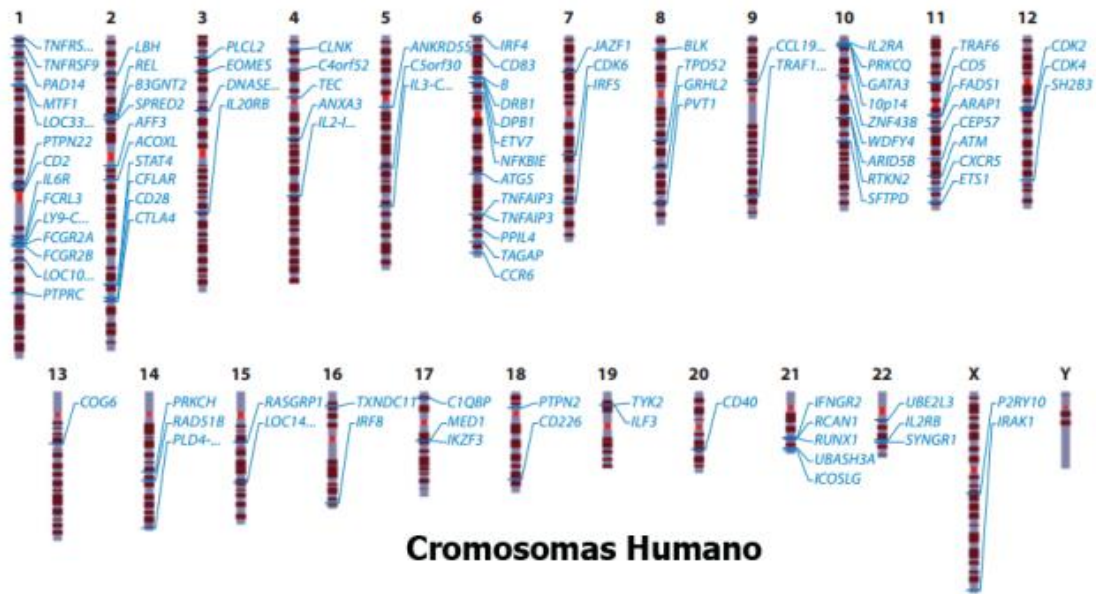
Estos estudios se diseñaron con la intención de cubrir las limitaciones observadas en los estudios de genes candidato y se basan en el enorme avance del conocimiento de los patrones de variación genética humana del proyecto internacional HapMap [184, 307]. El desarrollo de técnicas de genotipado masivo en grandes cohortes de pacientes está permitiendo identificar marcadores genéticos asociados con múltiples enfermedades incluida la AR (Figura 21). En la figura 20 se muestran los resultados del primer estudio de GWAS realizado en 2007 por el *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC) en el Reino Unido. En él se analizaron 2.000 casos y 3.000 controles y se confirmó el papel de los genes *HLA* y *PTPN22* entre otros [308].

Figura 20. Primer estudio de asociación de genoma completo en AR.



Estudio realizado en Reino Unido por el WTCCC [308]. Los cromosomas se señalan con alternación de colores azul y celeste. Las señales de asociación con valores de significación que oscilan entre 10^{-5} y $5 \cdot 10^{-7}$ se encuentran marcadas de color rojo. Las señales de asociación más fuertes se localizaron en las regiones de *HLA-DRB1* en el cromosoma 6 y *PTPN22* en el cromosoma 1. Además, se observó también asociación de otros 9 SNPs con la AR ($P=10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-7}$).

Figura 21. Lista de los genes identificados mediante estudios GWAS en AR organizados y visualizadas según su posición en los distintos cromosomas.



En esta figura adaptada del artículo de Terao y colaboradores en 2016 [309]. Podemos ver los distintos SNPs identificados hasta la fecha en estudios de GWAS [309].

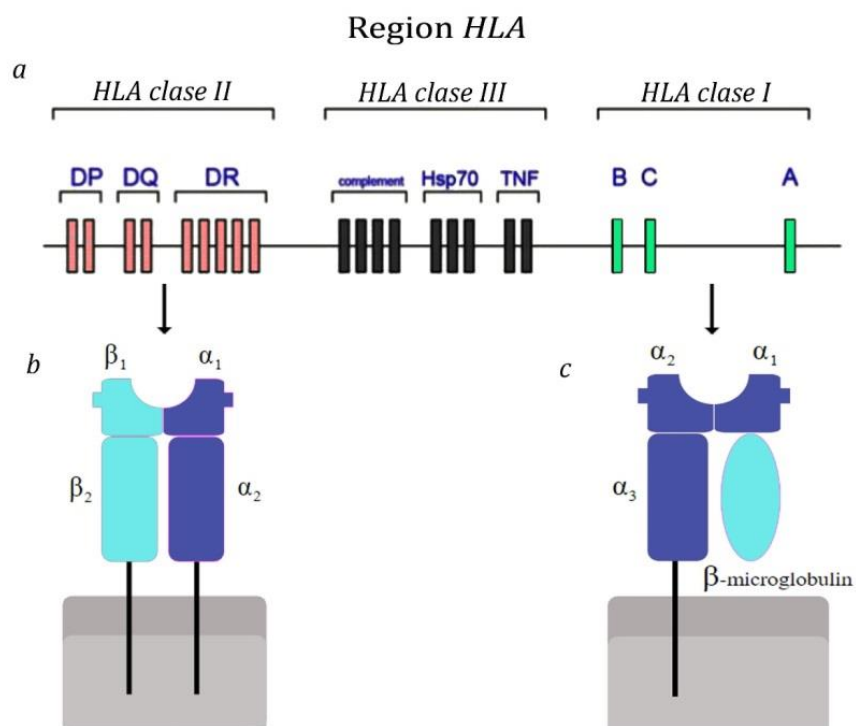
4.4.1. Región del gen *HLA*.

Los antígenos leucocitarios humanos (*HLA*) están localizados en el brazo corto de cromosoma 6p21 que contiene alrededor de 220 genes que codifican para 132 proteínas aproximadamente. Todas ellas tienen funciones inmunorreguladoras ya que actúan como moléculas de reconocimiento y señalización entre las células del sistema inmunitario. Esta región consta de 3.6 Mb que corresponde a un 0.13% del genoma y está relacionada con gran cantidad de enfermedades autoinmunes incluida la AR.

El *HLA* está dividido en tres regiones (Figura 22): el *HLA clase I* (compuesto por *HLA-A*, *C* y *B*) que está formado por glucoproteínas de superficie de membrana presentes en todas las células nucleadas y que se encargan de presentar a los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) fragmentos de proteína derivados de la acción de proteínas citosólicas. El *HLA clase I* consta de dos cadenas polipeptídicas, una cadena ligera soluble denominada α (12 kD) que presenta la variedad antigénica y la cadena pesada transmembrana llamada β 2-microglobulina (45 kD) que junto con la fracción α 3 le otorga función biológica a la molécula. Ambas cadenas están unidas de forma no covalente. En segundo lugar, tenemos el *HLA clase II* (constituido por los *HLA-DP*, *DQ* y *DR*) que son proteínas transmembrana y se encuentran localizadas en células B, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales del timo, DCs y de células de Langerhans. Las moléculas *HLA* de clase II están formadas también por dos cadenas heterodiméricas una α (cadena ligera de 32 kD) y otra cadena β (cadena pesada de 28 kD) que presentan antígenos intra- y extracelulares a linfocitos T colaboradores ($CD4^+$). Finalmente, el *HLA clase III* (*complemento*, *Hsp70* y *TNF*) es una región del cromosoma 6 encargada de codificar para diversas moléculas importantes en procesos

proinflamatorios como son los componentes del complemento (C2, C4 y el factor B), las linfotóxicas α y β y las proteínas del choque térmico y el TNF.

Figura 22. Esquema y estructura de la región HLA.



La imagen nos muestra las tres clases de moléculas HLA que hay en el genoma humano (a) y el esquema de la estructura morfológica de *HLA clase I* y *HLA clase II*, respectivamente (b y c).

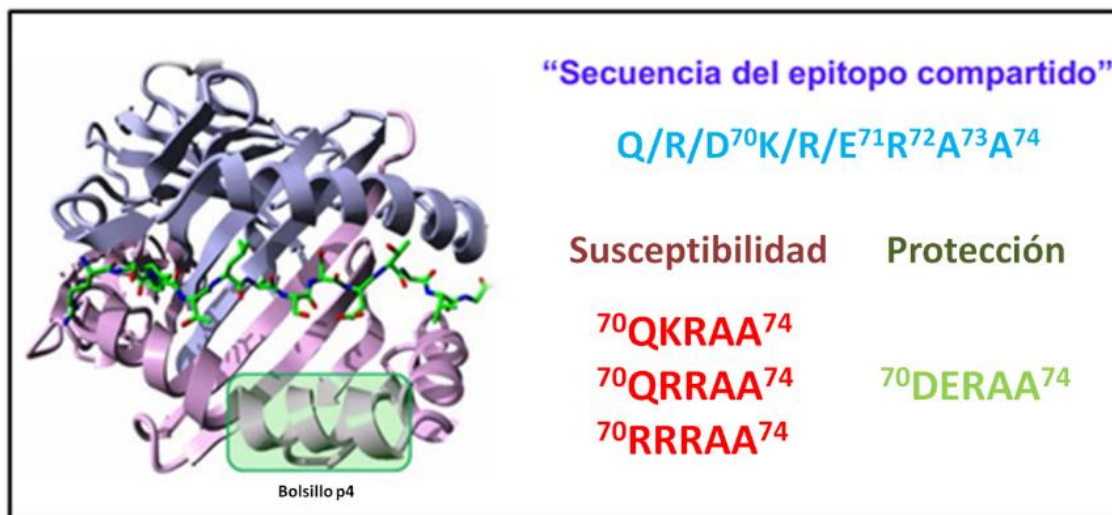
La región HLA es altamente polimórfica (descritos más 120000 alelos). En 1976 Peter Stastny determinó múltiples alelos del gen *HLA-DRB1* asociados con el riesgo de susceptibilidad a desarrollar AR [280]. Esta región se caracteriza por presentar secuencias aminoacídicas muy similares que dan lugar a proteínas HLA con función biológica semejante. Las secuencias aminoacídicas que da lugar a dichas funciones están comprendidas entre las posiciones 70 y 74 y están localizadas en la tercera región hipervariable (HVR3) de la molécula *HLA-DRB1*. Estos residuos forman un bolsillo α -hélice denominado bolsillo p4 que facilita la función de reconocimiento y unión del péptido antigénico [310] (Figura 23). El epítipo Compartido o *shared epitope* (SE) [281], solo se ha detectado entre un 30-50% de pacientes con AR [280, 311]. Se le reconoce un gran papel en determinación de la AR ya que se ha asociado con la producción, presencia y liberación de autoanticuerpos como el FR y los anti-CCP, que son claves en el desarrollo de la enfermedad [312, 313]. Además, la presencia del *HLA-DRB1*SE* en los pacientes con AR está relacionado con un peor pronóstico y, por tanto, una mayor destrucción articular y desarrollo de manifestaciones extraarticulares [314-316] (Tabla 10).

Tabla 10. HLA-DRB1*SE y su significancia clínica en la AR.

| GENOTIPO HLA-DRB1 *SE | SECUENCIA AA | | | | | GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD |
|-----------------------|--------------|----|----|---------|------------|---------------------------|
| | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | |
| *0101 | Q | R | R | A | A | Intermedia |
| *0102 | Q | R | R | A | A | Intermedia |
| *0103 | D | E | R | A | A | Protectivo |
| *0401 | Q | R | R | A | A | Severa |
| *0402 | D | E | R | A | A | Protectivo |
| *0404 | Q | R | R | A | A | Intermedia |
| *0405 | Q | R | R | A | A | Intermedia |
| *0408 | Q | R | R | A | A | Intermedia |
| *1001 | R | R | R | A | A | Intermedia |
| *1102 | D | E | R | A | A | Protectivo |
| *1103 | D | E | R | A <td A | Protectivo | |
| *1301 | D | E | R | A | A | Protectivo |
| *1302 | D | E | R | A | A | Protectivo |
| *1402 | Q | R | R | A | A | Intermedia |

Datos basados y adaptados del artículo Chung y colaboradores en 2016 [317]. AA: Amino Ácido.

Figura 23. Localización del HLA-DRB1*SE en la molécula HLA de clase II y secuencias de aminoácidos que codifican para el SE.



En esta imagen el cuadro verde marca la posición de la HVR3 entre los aminoácidos 70-74 de la molécula HLA de clase II. Estos aminoácidos son esenciales para la formación del bolsillo p4 que se une a péptidos específicos desencadenando la señal inmunológica lo que, en última instancia, incrementa el riesgo a desarrollar AR. Figura adaptada del trabajo de Boots y colaboradores [318].

4.4.2. Regiones no HLA.

Los estudios genéticos se centran principalmente en identificar nuevos genes implicados en el desarrollo de AR que nos permitan conocer mejor las bases

moleculares de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias. La mayor parte de los nuevos SNPs identificados se encuentran en regiones no HLA. Entre ellos destacan el *TIM-3*, *IL23R*, *TRAF1/C5*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *CCR6*, *PADI4*, *FCGR2A* y *PTPN22*.

El gen *TIM-3* codifica un marcador de membrana presente en linfocitos Th1, Th17, Treg, monocitos, DCs, mastocitos y microglía y cuya función es aún desconocida [319-323]. El gen *IL23R* codifica un receptor que se une a la IL12R β 1 actuando como mediador entre células T y NK y activa la cascada de señalización Jak-Stat [324]. El gen *TRAF1/C5* está localizado en el cromosoma 9 y codifica una proteína intracelular que media en la señal de transducción a través de los receptores 1 y 2 del TNF y participa en la perpetuación de la inflamación [325]. Por otra parte, el *CTLA4* codifica para un receptor proteico cuya función está relacionada con una regulación negativa de la activación de las células T. Este gen ha sido muy estudiado en el contexto de la AR y se ha usado como diana terapéutica en AR entre otras patologías autoinmunes [2]. El gen *IRF5* es un factor de transcripción que modula el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis y diversas actividades del sistema inmunitario mientras que *STAT4* es un gen que codifica una proteína necesaria para la diferenciación de las Th a Th1 y la producción de INF γ en respuesta a IL12. Por otro lado, el gen *CCR6* codifica para una quimiocina codificada por células Th17 que correlaciona con los niveles serológicos de IL17 en pacientes con AR [326]. El gen *PADI4* codifica para la enzima peptidil-arginina-deaminasa que está implicada en la transformación de arginina a citrulina y parece tener un papel mediado por los granulocitos y los macrófagos que activan la respuesta inmunitaria y liberación de autoanticuerpos anti-CCP [327, 328]. Finalmente, el gen *Fc γ R2A* codifica para un receptor de membrana localizado en macrófagos y neutrófilos y que se encarga del aclaramiento de ICs [329, 330] y el *PTPN22* que media su acción a través de la modulación del interferón [331].

A todas las variantes genéticas incluidas en los genes anteriormente mencionados se suman aquellas de menor frecuencia identificadas mediante técnicas de secuenciación masiva del genoma completo (*PTPN22*, *IRF5*, *BLK*, *UBE2L3*, *STAT4*, *IRF8*, *DDX6*, *CXCR5*, *PRDM1* y *ATG5*). Todos estos hallazgos nos están ofreciendo una información muy importante para entender mejor los mecanismos que conducen al desarrollo de AR y están ayudando a valorar con más precisión el papel que juegan los autoanticuerpos en la enfermedad y en la respuesta a los tratamientos [327]. En 2017, Shchetynsky y colaboradores identificaron nuevas variantes genéticas en los genes *ERBB2*, *TP53* y *THOP1* [332].

Los estudios GWAS están generando grandes cantidades de información que está resultando ser de gran utilidad para mejorar el conocimiento de la AR. Una prueba de esto lo constituye el hecho de que algunos de los genes identificados por GWAS son actualmente dianas terapéuticas para tratar la enfermedad. Aunque el desarrollo de los fármacos no provino de los datos de GWAS, es importante reconocer el paralelismo de los datos GWAS con los estudios clínicos que han dado lugar al desarrollo de la mayor parte de fármacos biológicos. Entre los ejemplos más destacados encontramos

el tocilizumab (IL6R), el abatacept (CTLA4) o los fármacos anti-TNF α (TNF α) todos ellos dirigidos contra moléculas con un papel destacado en estudios GWAS [333].

En el campo de la farmacogenómica una gran parte de los estudios se han centrado en la vía del TNF α en la que se han identificado un importante número de marcadores genéticos asociados con la respuesta a tratamiento con fármacos anti-TNF. Entre los genes más destacándose encontramos genes como el propio *TNF α* , pero, además, genes como el *TNFRSF1B*, el *TNFRSF9*, la *IL10*, la *DHODH*, el *ESR1* o el *CYP1A2* [181, 330, 333-335]. En lo que se refiere a los estudios de genes candidatos es importante destacar que han servido para identificar múltiples variantes genéticas en diferentes genes de interleucinas y sus receptores (IL4, IL4R, IL6, IL12RA, IL12RB, IL10, IL2, IL1 β) [336-340] pero, además, genes que codifican para moléculas de adhesión (CD40) [341], lectinas (DC-SIGN, Dectina-1), receptores de las células T (TLR2, TLR4, TLR9, TLR7) o proteínas implicadas en la ruta de la IL17 (CCR6, CCL20) [342]. Sin embargo, a pesar de que los grandes avances en este campo nos han permitido definir perfiles de riesgo, aún son necesarios más estudios para poder trasladar la información genética a la práctica clínica.

4.5. Modelos predictivos de riesgo genético y respuesta terapéutica en AR.

La identificación de nuevas variantes genéticas asociadas con la susceptibilidad a AR y la respuesta terapéutica ha avanzado notablemente en las últimas décadas [289, 334, 343-346]. Aunque los investigadores aún no han conseguido trasladar la gran mayoría de estos conocimientos a un contexto clínico, se ha comenzado a diseñar modelos genéticos de riesgo y pronóstico e incluso de respuesta terapéutica debido a la alta prevalencia de la enfermedad y al alto grado de fracaso terapéutico. Entre estas iniciativas cabe destacar el modelo descrito por van der Helm-van en 2007 que analizó el porcentaje de pacientes con AR indiferenciada que finalmente desarrollaban AR (30% frente al 1% que presenta la población general) [347]. Además, otros modelos en el contexto de ensayos clínicos (ASPIRE, BeST, SWEFOT y ESPOIR) trataban de predecir la progresión de la enfermedad. Alguno de estos modelos ha ido un poco más allá y ha usado parámetros como el MBDA (*multi-biomarker disease activity*) y el SCORE (*systematic coronary risk evaluation*) con un éxito discutible probablemente por la ausencia de datos genéticos [348]. En la actualidad se están adaptando los modelos ya existentes incluyendo marcadores genéticos y, aunque todavía no han sido validados, se espera que ganen en consistencia y fiabilidad [349, 350]. Un primer intento de incluir datos genéticos en los modelos predictivos lo llevó a cabo el equipo de Wessels en 2007 que integraron junto con variables clínicas y ambientales cuatro marcadores genéticos con la intención de predecir la respuesta a metotrexato [351]. En la actualidad, el modelo más completo se publicó en 2015 por Yarwood y colaboradores e incluía el análisis 46 *loci* relacionados con la enfermedad [352]. Su éxito fue relativo por lo que se deben realizar más esfuerzos en esta área de trabajo.

5. Las hormonas esteroideas y su papel en AR.

La incidencia de AR es diferente en hombres y mujeres [353] y éstas presentan una enfermedad más agresiva con un peor pronóstico. La ratio de incidencia entre mujeres y hombres oscila entre 3 y 4 (3-4/1) en etapas previas a la menopausia y se reduce a la mitad en este periodo (2/1) [87, 175, 354-356]. Como consecuencia de estos datos se ha sugerido la implicación de las hormonas sexuales en la regulación de procesos inflamatorios que originan la enfermedad [357].

Las hormonas esteroideas son compuestos derivados del colesterol (un esteroide) y se pueden clasificar en cinco grupos atendiendo al receptor al que se unen: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, y progestágenos. Además, existe otro grupo de proteínas que se unen a un grupo de receptores homólogos tipo II (no receptores nucleares), cuyos ligandos son no esteroideos, son los retinoides, la vitamina D y hormonas tiroideas. Las hormonas esteroideas se sintetizan en las gónadas y las glándulas suprarrenales y se unen a inmunoglobulinas específicas que se conocen con el nombre de globulina fijadoras de hormonas sexuales o globulina fijadoras de cortisol que son transportadas por el torrente sanguíneo a las diferentes partes del cuerpo donde ejercen su función.

5.1. Implicación y regulación de las hormonas esteroideas en las diferentes etapas de las mujeres a lo largo de su vida y el papel que desempeña las hormonas esteroideas en pacientes con AR.

El sistema neuroendocrino juega probablemente un papel clave en el desarrollo de la AR [358]. Es ampliamente conocido que las hormonas esteroideas están implicadas en la regulación del sistema inmunológico y participan en el control de fases preclínicas de la enfermedad y durante el curso de esta [359]. El sistema neuroendocrino está controlado por medio del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) que es capaz de auto-regularse a diferentes niveles. Esta autorregulación permite que las hormonas esteroideas estén estricta y continuamente controladas. Un desequilibrio en este eje ocasiona diversos desordenes patológicos.

El papel de las hormonas esteroideas en la AR no está claro y los trabajos publicados hasta la fecha muestran datos contradictorios, pero se sospecha de su implicación por la elevada disparidad en la incidencia entre hombres y mujeres y el peor pronóstico observado en estas últimas.

Cuando se han analizado los parámetros hormonales en los hombres y su relación con la severidad y progresión de la enfermedad e incluso la respuesta al tratamiento, se ha observado que los niveles de las hormonas sexuales masculinas correlacionan positivamente con buen pronóstico y sistemáticamente menos severa que en las mujeres [360, 361]. La principal hormona esteroidea masculina es la testosterona y sus principales funciones están relacionadas con un aumento de la respuesta Th2 que bloquea la vía Th1 a través de la activación de la vía PTPN1-STAT4 e IL12R y la secreción de IL10 que promueve un ambiente antiinflamatorio. Además, la testosterona inhibe

la diferenciación de los linfocitos B, la síntesis de autoanticuerpos y la proliferación de fibroblastos [362-364].

En el caso de las hormonas sexuales femeninas los datos no son tan consistentes ya que los niveles hormonales no son siempre constantes y las funciones de los estrógenos también varían a lo largo de la vida de la mujer viéndose afectados por la nuliparidad, el embarazo, el posparto, la lactancia, la menopausia y/o el uso de anticonceptivos orales [365]. En mujeres embarazadas y lactantes con altos niveles de (E2) y progesterona en suero, la sintomatología y signos clínicos disminuyen un 75%. Además, se ha observado que después del embarazo los niveles de estas hormonas esteroideas caen radicalmente y las pacientes vuelven a recaer presentando, en ocasiones, una enfermedad más agresiva que la que presentaban antes del embarazo [366, 367]. Por otra parte, durante la fase peri-menopáusica se produce un descenso paulatino del número de folículos, controlado por un aumento de la FSH, lo que causa una marcada reducción de los estrógenos y andrógenos [175, 354] y un incremento de la susceptibilidad a desarrollar AR [175]. A pesar de todos estos datos, Maure y colaboradores describieron que en los distintos fluidos corporales los niveles de hormonas sexuales son similares en hombres y mujeres [368]. En ambos casos los niveles tanto de estrógenos como de andrógenos se encontraban reducidos. Además, en pacientes con AR, se identificaron bajos niveles en suero de DHEAS y estrógenos, con un incremento de los niveles de E2 en pacientes con AR pero sin diferencias entre mujeres y hombres [369, 370]. Los datos obtenidos se pueden explicar por el posible incremento en la actividad de las aromatasas que están fuertemente reguladas por el TNF α , la IL1 y la IL6 [368]. En esta línea también se ha observado que no existen datos consistentes que apoyen el papel protector de la administración de anticonceptivos orales en mujeres posmenopáusicas [371], pero se ha descrito un efecto negativo de la hormona DHEAS sobre el riesgo a desarrollar AR tanto en mujeres premenopáusicas como menopáusicas [372]. D'Elia y colaboradores, también describieron que el uso de vitamina D (con o sin administración de calcio) estaba relacionado con un descenso en procesos inflamatorios y destrucción articular y ósea [373].

A nivel de membrana sinovial inflamada se ha descrito que los niveles de estrógenos son bajos y se relacionan con un aumento de las principales citocinas proinflamatorias (TNF α , IL1 y IL6) y el bloqueo de citocinas antiinflamatorias, lo que se traduce en un mayor riesgo a desarrollar AR y, generalmente, un peor pronóstico [21, 140]. A su vez, estas citocinas modulan la síntesis de las hormonas esteroideas a nivel de la corteza adrenal mediante la secreción de hormona corticotropina y la hormona adrenocorticotropina [374]. Los glucocorticoides inhiben directamente la ruta de señalización NF κ B activando al factor de transcripción AP-1 que reduce el foco inflamatorio a través de la inhibición de la citocina IL1 [375].

Con relación al papel de las hormonas sexuales en AR es necesario destacar el papel que juega el eje HHA. Se ha demostrado que unos niveles bajos en la producción de andrógenos en la corteza adrenal se correlacionan con una alta actividad inflamatoria

en el contexto clínico [376]. El eje HHA está regulado genéticamente y se ha propuesto que la presencia de ciertos polimorfismos genéticos en genes implicados en la regulación de la producción de hormonas glucocorticoides puede estar asociada con el desarrollo de AR [377, 378]. Se han identificado polimorfismos en los genes *TthIII 1* (rs10052957), *ER22/23EK* (rs6189 y rs6190), *N363S* (rs6195), *BclI* (rs41423247), y *NR3C1* (rs6198) y, mediante estudios de haplotipos, se ha demostrado además que las variantes en los genes *ER22/23EK* y *NR3C1* están relacionadas con un aumento en la predisposición a desarrollar AR mientras que las variantes *N363S* y *BclI* protegen de la enfermedad [379]. En relación con la regulación con los niveles de DHEAS en suero también se han identificado 8 variantes en los genes *ZKSCAN5* (rs11761528), *SULT2A1* (rs2637125), *HHEX* (rs2497306) y *ARPC1A* (rs740160) asociadas con un mayor riesgo a desarrollar AR [359].

5.2. Efecto de las hormonas esteroideas en los distintos tipos celulares.

Estrógenos:

- **Macrófagos.** Los estrógenos actúan en mayor medida a través del ESR1 activando la producción de citocinas proinflamatorias en respuesta a estímulos mediados por TLRs [380]. Sin embargo, se ha visto que en mujeres embarazadas los estrógenos inhiben la liberación de citocinas proinflamatorias disminuyendo los efectos inflamatorios [381].
- **Células dendríticas.** En DCs los estrógenos parecen actuar principalmente a través del ESR2 ya que es el receptor estrogénico más expresado en este tipo celular [380]. Estos receptores intervienen en su maduración y bloqueando el reclutamiento de las células presentadoras de antígeno, la interacción con los linfocitos T y la liberación de citocinas proinflamatorias [382].
- **Células T.** En este caso no hay diferencias por género o estado fisiológico en la expresión de los dos tipos de ESRs [380]. Los estrógenos inhiben la diferenciación y maduración de las células Th1 y Th17 bloqueando así sus diferentes vías de acción que son, principalmente, proinflamatorias. Además, los estrógenos son capaces de activar a las células Treg y secretar citocinas antiinflamatorias (IL4, IL5, IL6 e IL10) promoviendo así un predominio de la vía Th2. Esos efectos están acentuados en mujeres embarazadas [381] lo que podría explicar la remisión de la enfermedad durante este periodo. Como cabe esperar, la bajada de los estrógenos desencadena la maduración y diferenciación de las células T, la secreción de IFN γ y la activación de la vía Th1 [381, 383, 384].
- **Células NK.** En este caso los estrógenos ejerce un efecto supresor de la actividad citotóxica de las células [384].
- **Células B.** Al igual que las células T, la expresión de los dos tipos ESRs parece ser similar en hombre y mujeres y esta autorregulada durante los diferentes estados fisiológicos [380]. Sin embargo, en algunos trabajos se ha descrito que

los niveles de expresión de estos receptores son mayores en mujeres que en hombres [385]. Los estrógenos se autorregulan por factores de transcripción de genes tales como *BCL2*, *IRF5* y *AICD*. Los receptores una vez unidos a su sustrato suprimen la linfopoyesis de la células B en la medula ósea, la recombinación de células B maduras por la vía clásica y disminuyen la apoptosis de células B autorreactivas [386]. Un incremento de los niveles de estrógenos fuera de la medula ósea desencadena un aumento de la supervivencia de las células B y, por tanto, incrementan los clones autorreactivos y la producción de autoanticuerpos IgM e IgG [381, 383, 384].

- **Neutrófilos.** Los estrógenos inhiben la apoptosis en este tipo celular [384].
- **Monocitos.** Presentan altos niveles de ESR1 y su expresión parece variar en función del sexo y el estado fisiológico. Curiosamente, se ha descrito que los estrógenos y la progesterona reducen el número de monocitos en el foco inflamatorio [384].
- **Osteoclastos.** En los osteoclastos los estrógenos impiden la reabsorción ósea y aumentan los procesos antiapoptóticos en los tejidos [387].
- **Condrocitos.** Los estrógenos bloquean las MMP-13 provocando la inhibición de la degradación del cartílago sinovial [388].

Progesterona:

- **Macrófagos.** Estudios *in vitro* han demostrado que bloquea el TNF α [389]. En el caso de pacientes embarazadas se ha detectado que la progesterona actúan sinérgicamente disminuyendo la actividad y progresión de la enfermedad [381].
- **Células dendríticas.** En modelos murinos se ha visto que la progesterona activa la vía Th2 y las células Treg. La progesterona parece estimular la capacidad de presentación antigénica y la diferenciación de células T CD4⁺ y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa mediante la estimulación de los receptores mPR, iPR y GR [390, 391]. Por otra parte, la progesterona en las DCs plasmacitoides induce la expresión de receptores de la progesterona de membrana lo que estimula la producción de INF α en mujeres. Este hecho ha favorecido que se plantee el uso de anticonceptivos progestágenos para la reducción la inflamación [390, 392].
- **Células T.** La progesterona inhibe la proliferación de las células CD4⁺ evitando la diferenciación a Th1 y favoreciendo la estimulación de las células Treg y Th2 y la liberación de IL4 y IL10. Es por ello que se ha sugerido que la progesterona sea la hormona responsable de la remisión de la enfermedad durante el embarazo [381, 390]. En el caso de las células T CD8⁺ la progesterona disminuye su actividad citotóxica a través del bloqueo de los poli ácido glicólico (PGA) de membrana.
- **Células NK.** Las células NK la progesterona induce la apoptosis y bloquea la secreción de INF γ por medio de receptores de la progesterona intracelulares.

Ensayos *in vitro* han demostrado que la progesterona inhibe de manera directa o indirecta la acción de las células NK [390, 393].

- **Células B.** Aunque no está demostrado se piensa que la progesterona participa en la respuesta inmunitaria modulando la diferenciación y maduración de los linfocitos B y en la generación de anticuerpos por lo que podría disminuir otras cascadas de señalización inflamatorias como son la del sistema del complemento y los FcR de las células inmunitarias especializadas [394]. Además, es conocido que, durante el desarrollo, selección y supervivencia de las células B, la progesterona tiene un efecto opuesto a los estrógenos [381, 390].
- **Neutrófilos.** En este caso la progesterona inhibe funciones como la apoptosis y la secreción de iones superóxido lo que podría relacionarse con la capacidad para reducir la deformación articular y la destrucción ósea [390].

6. El papel de la vía NFκB y sus variantes en la AR.

El factor de transcripción nuclear kappa b (NFκB) se describió por primera vez en 1986 [395] y se observó que intervenía modulando y potenciando la transcripción de las cadenas ligeras Kappa en células B activadas [395]. Más adelante se supo que estaba constituido por un conjunto de proteínas que formaban un complejo cuya función principal era la de regular a otros factores de transcripción [395]. El complejo NFκB responde a multitud de estímulos tales como el estrés, los niveles de citocinas proinflamatorias, la radiación ultravioleta, la presencia de LDL oxidada y frente a multitud de antígenos bacterianos y/o virales entre otros patógenos. Además, este complejo se encuentra en la mayoría de los tipos celulares [280, 396-400] y su activación se produce a través de múltiples receptores celulares que incluyen el TNFR1, el IL-1R1, los TLRs, el BCR, el TCR, el LTβR, el BAFFR y el CD40 [401]. La vía del NFκB tiene un papel relevante en la respuesta inmunitaria y su desregulación está relacionada con la aparición enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, además cáncer e infecciones [402-407]. Se sabe que, al mismo tiempo de modular la respuesta inmunológica, puede regular la transcripción de genes que codifican para moléculas de adhesión y genes implicados en procesos de diferenciación, proliferación, angiogénesis, estrés celular, tumorigénesis, supervivencia celular y apoptosis [408, 409]. En condiciones naturales el NFκB se encuentra en el citoplasma celular en forma inactiva formando homo y/o heterodímeros con proteínas inhibidoras del complejo que, por diferentes estímulos, pueden ser fosforiladas, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma provocando su translocación de al núcleo donde va a desempeñar su función regulando los distintos factores de transcripción de los genes diana [410]. El papel realizado por el NFκB dependerá del estímulo recibido en el citoplasma.

6.1. Vías de señalización mediadas por el NFκB.

Las vías mediadas por el NFκB se conocen como canónica, no canónica y atípica. Estas tres vías se caracterizan porque los estímulos que las activan son diferentes y, además, pueden ser dependientes (canónica y no canónica) o independientes de IKK (vía atípica), es decir, necesitar o no de la unión con las serina-treonina quinasas para la translocación del complejo al núcleo.

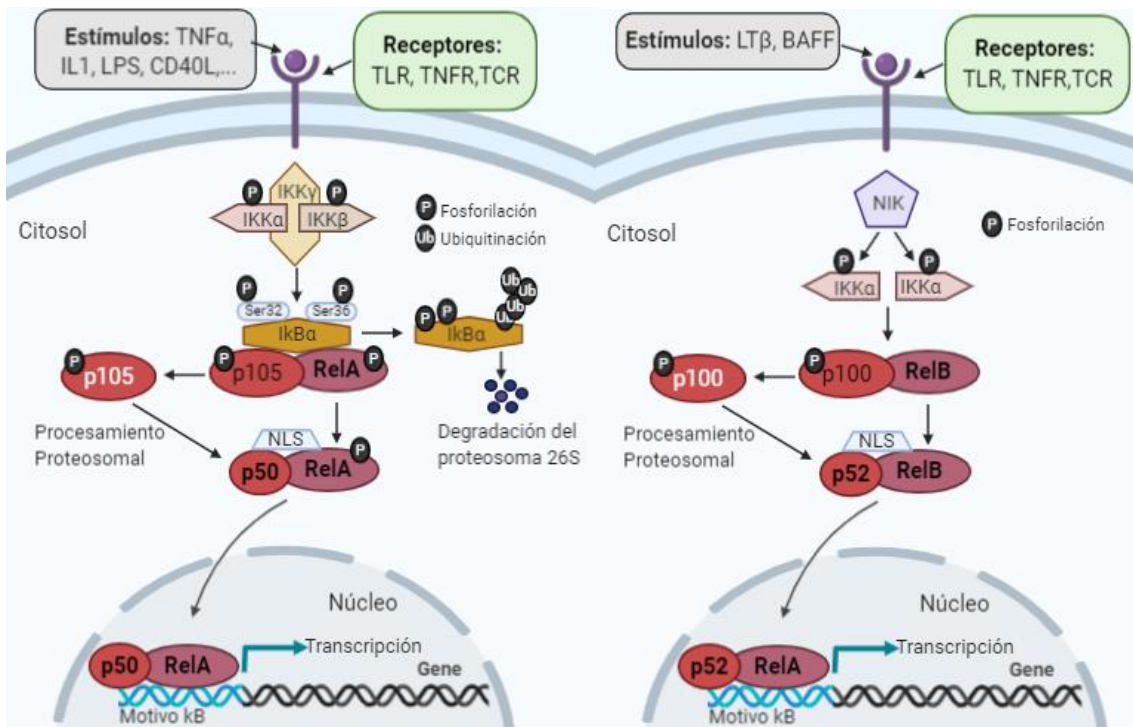
6.1.1. Activación de NFκB por la vía canónica.

La vía canónica (Figura 24) es la ruta predominante de activación de NFκB y en su complejo proteico participan RelA, c-Rel y NFκB1 (p50). En esta vía la proteína que bloquea al dímero NFκB es la IκBα y las enzimas responsables de la activación son la IKKα y la IκBβ. La vía canónica se activa por estímulos de citocinas proinflamatorias como el TNFα y la IL1, pero también por falta de glucosa y el estrés oxidativo, entre otras causas. Estos estímulos ocasionan la fosforilación mediada por IKKs de residuos de serina de la proteína inhibidora del dímero IκBα que realizan el procesamiento proteolítico por fosforilación de la subunidad p105 a p50 y la liberación de residuos NLS (secuencias de localización nuclear) en RelA que dejan expuesto el dominio κB de unión al ADN. Una vez finalizado este proceso el dímero NFκB se transloca al núcleo de la célula donde se unirá al ADN diana e iniciará su función [411, 412]. Esta vía se desencadena normalmente frente a infecciones microbianas o virales.

6.1.2. Activación de NFκB por la vía no canónica.

La activación de NFκB por la vía no canónica (Figura 24) se realiza mediante la enzima IKKα que se encarga de activar a los dímeros de NFκB por medio de una quinasa llamada NIK (acrónimo del inglés, NFκB-inducing kinase). En este proceso de activación los dímeros que nos encontramos son RelB y NFκB2 (p52) y la activación de la enzima NIK se lleva a cabo a través de la fosforilación de IKKα que entonces realiza la fosforilación y el procesamiento proteolítico de p100 transformándolo en su forma activa (p52) y favoreciendo su unión a RelB con la consiguiente translocación de NFκB al núcleo. Los estímulos responsables de desencadenar esta vía no canónica son la linfotoxina B, el ligando de CD40 y el factor de la activación de las células B [413-417].

Figura 24. Esquema de la activación de la vía canónica de NFκB y esquema de la activación de la vía no canónica de NFκB, respectivamente.



6.1.3. Activación de NFκB por la vía atípica.

La activación de NFκB por la vía atípica se lleva a cabo de una forma similar a la vía canónica, pero en este caso la proteína inhibidora IκBα es fosforilada en sus residuos de treonina a través de un mecanismo independiente de IKK. Una vez que la IκBα es fosforilada en los residuos de treonina el dímero RelA/NFκB1 (p50) se transloca al núcleo para unirse a las regiones diana del ADN. Esta vía atípica se ha observado fundamentalmente en el sistema nervioso y los estímulos que la desencadenan son el peróxido y la eritropoyetina entre otros.

6.2. Regulación postranscripcional de NFκβ.

Es importante recordar que existen otras maneras de regular la vía NFκB a través de procesos postraduccionales de la proteína RelA. Esta regulación se puede llevar a cabo de manera directa o de forma indirecta. RelA se puede regular por fenómenos de fosforilación [418] en los diferentes dominios homólogos REL (RHD) y dominio de activación transcripcional (TAD) o por acetilación en residuos de lisina en el núcleo [419].

6.3. Vías de señalización de NFκB, asociado con la AR

La vía de señalización del NFκB tiene un papel relevante en la AR ya que está presente en múltiples procesos biológicos que ocurren durante el desencadenamiento de la enfermedad y su progresión.

Se ha detectado que NFκB está activado en la membrana sinovial de pacientes con AR tanto en etapas tempranas como avanzadas de la enfermedad [420-423]. Una vez que esta vía se activa se desencadenan tanto la vía canónica, que es rápida pero transitoria, como la vía no canónica que produce una señalización menos inmediata pero más duradera. Aunque es frecuente observar que ambas vías estén activadas durante la AR, se ha observado que la activación de la vía canónica generalmente se asocia con fenómenos proinflamatorios mientras que la inducción de la vía no canónica está vinculada a procesos de desarrollo [424]. En la AR la activación aguda de la vía canónica en las células presentadoras de antígeno y las células T conduce rápidamente a la producción de un amplio abanico de mediadores proinflamatorios entre los que se encuentran varias citocinas (TNFα, IL1α, IL1β, IL1RA, IL2, IL12p40 y IFNγ), quimiocinas (IL8, CXCL11), inmunorreceptores (CD80, CD23, CD48, CD69, IL2R, TNFR y CCR5), moléculas de adhesión celular (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina) y factores de crecimiento (GM-CSF, IGFBP2, y PDGFB), que a menudo facilitan la hiperplasia sinovial al promover la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis de FLS [425]. Por el contrario, la activación de la vía no canónica implica una lenta acumulación de señales duraderas que se han implicado en procesos de desarrollo entre los que cabe destacar el desarrollo de células B [426], de órganos linfoides secundarios [427, 428] y la diferenciación de osteoclastos [429], pero también desarrollo de células dendríticas mieloides CD4⁺ CD8α⁻ y macrófagos [430] que son claves en la modulación de la respuesta inmunitaria en AR.

7. Estrategias terapéuticas en la AR.

Actualmente no existe ningún fármaco curativo para el tratamiento de la AR entre otras cosas debido a las importantes limitaciones en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad. No obstante, disponemos de tratamientos para paliar los procesos inflamatorios subyacentes a los signos y síntomas de la patología y mantener o restablecer las funciones articulares. Los fármacos para el tratamiento de la AR se clasifican en tres grandes grupos: antiinflamatorios no-esteroides (NSAIDs), corticosteroides y fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FAMEs o DMARDs). Estos últimos son fármacos sintéticos o biológicos [1, 431]. En los últimos años la irrupción de las terapias biológicas ha sido un gran paso en el tratamiento de la AR ya que ha permitido tratar a los pacientes en fases tempranas de la enfermedad, reduciendo así los procesos inflamatorios, la progresión radiológica y la agresividad de la enfermedad. Sin embargo, todavía existe un elevado porcentaje de los pacientes que presentan fracaso terapéutico.

7.1. Tratamientos biológicos y no biológicos.

Los individuos diagnosticados con AR deben seguir unos protocolos terapéuticos establecidos por grupos cooperativos nacionales como la Sociedad Española de Reumatología [432] o internacionales como el *American College of Rheumatology* (ACR) o *European League Against Rheumatism* (EULAR).

7.1.1. Tratamiento de primera línea o elección (fármacos no biológicos).

Los pacientes de AR una vez diagnosticados según los criterios ACR/EULAR son tratados de forma inmediata con FAMES o DMARDs. Los fármacos más utilizados en esta fase terapéutica incluyen el metotrexato (MTX), la leflunomida (LFN), la y sulfasalazina (SSZ) [433], que son administrados conjuntamente con corticosteroides suministrados por vía intramuscular o intraarticular. La finalidad de dichos tratamientos es frenar los signos y síntomas de la enfermedad y retrasar la aparición de lesiones en el cartílago y erosiones del tejido óseo [319].

Fármacos no biológicos:

- **MTX:** Es metotrexato el fármaco más estudiado en la actualidad suele ser el fármaco de elección en primera línea de tratamiento a dosis bajas para evitar la hepatotoxicidad. El MTX es un fármaco eficiente que actúa como agente antifolato ya que aumenta los niveles de adenosina extracelular y disminuye la concentración de agente tóxicos (poliamida) y la concentración intracelular del glutatión. El MTX es un antimetabolito sintético de la familia de los folatos y, al ser un análogo de la aminopterina, inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa que tiene como función la de convertir el dihidrofolato a tetrahidrofolato que es esencial para la síntesis de las bases nitrogenadas (purina, timina) y algunos ácidos nucleicos [434]. Debido a esta inhibición los pacientes que toman MTX deben completar el tratamiento con un suplemento de ácido fólico (vía oral), para evitar efectos secundarios graves.
- **LFN:** La leflunomida es un medicamento para tratar la AR moderada o grave y su función es similar al MTX inhibiendo la síntesis ADN. En este caso inhibe la enzima dihidroorotato deshidrogenasa que es necesaria para la síntesis *de novo* de pirimidina. Actúa principalmente inhibiendo la proliferación de linfocitos y de esa manera desplazando la respuesta inmunitaria hacia la vía Th2. La LFN reduce el daño en las articulaciones y las lesiones óseas y se puede combinar con tratamientos biológicos, pero nunca con MTX. El inconveniente más relevante es que en torno al 20% de los pacientes sufren procesos diarreicos que se van reduciendo cuando la administración se extiende en el tiempo.
- **SSZ:** La sulfasalazina es un fármaco que alivia el dolor y la hinchazón frenando la progresión de la enfermedad. Consiste en una combinación de salicilato (aspirina) y sulfamida (antibiótico) que actúa en la síntesis de prostanoïdes siendo capaz de inhibir a los linfocitos T, reducir los niveles de inmunoglobulinas circulantes, suprimir la activación del $\text{NF}\kappa\beta$, síntesis de factores inflamatorios y la absorción de folatos. El principio activo es la mesalazina (ácido 5-aminosalicílico) que produce pocos efectos secundarios. El único efecto secundario destacable es que reduce el recuento de esperma.
- **Las sales de oro intramusculares:** El aurotiomalato es un inhibidor de los factores de transcripción AP-1 y $\text{NF}\kappa\text{B}$ y, por tanto, actúa bloqueando múltiples funciones de los linfocitos y macrófagos. Además, es un fármaco que inhibe

fuertemente a las catepsinas K y S que son elementos imprescindibles en la reabsorción ósea y potencian la respuesta inflamatoria.

- **Cloroquina e hidroxicloroquina:** Estos fármacos surgieron en los laboratorios Bayer para el tratamiento de la malaria y se observó que eran potentes antiinflamatorios por lo que se propusieron para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias. Estos medicamentos, en particular la hidroxicloroquina, inhibe el ensamblaje de la cadena α y β del *HLA de clase II* en el citoplasma por medio de un incremento de pH. Como consecuencia la molécula de HLA no es capaz de procesar el reconocimiento de antígenos disminuyendo así los procesos inflamatorios y la destrucción articular y ósea.
- **Ciclosporina:** Este fármaco se encuentra dentro de los medicamentos inmunosupresores actúa inhibiendo la calcineurina fosfatasa impidiendo que se una en el citosol a su sustrato (ciclofilina) en los linfocitos T efectores evitando la actividad transcripcional del factor NFAT y, por consiguiente, la liberación de diferentes citocinas.
- **Penicilamina:** Es una sustancia quelante que modula los grupos sulfhidrilo y evita el reconocimiento correcto ente los factores de transcripción dificultando la señalización intracelular. Es un fármaco con muchas contraindicaciones debido a esto se debe de suministrar con mucha precaución y a dosis generalmente muy bajas. Presenta múltiples efectos secundarios adversos por lo que su administración está muy restringida y controlada.
- **Azatioprina (AZA):** La AZA interfiere en la síntesis del ADN porque es un análogo de las purinas y participa en la activación del metabolismo de la 6-mercaptopurina ocasionado la inhibición de la proliferación linfocitaria y la liberación de citocinas. Los efectos adversos suelen ser hematológicos (leucopenia) o gástricos (náuseas y vómitos). En ambos casos suelen ser leves.

La administración de los fármacos de primera línea en AR suele valorarse a los tres meses para comprobar el estado clínico y físico de los pacientes y analizar posibles episodios de toxicidad y fracaso terapéutico. Tras esta primera evaluación se decide si los pacientes deben continuar con el tratamiento a la misma dosis o si ésta debe aumentarse o disminuirse o incluso si es necesario cambiar de fármaco por fracaso terapéutico o por la presencia de fenómenos adversos relevantes. La evaluación del tratamiento se basa en el análisis del DAS28 y se considera la remisión cuando el DAS28 es menor de 2.6 o si el paciente presenta una actividad mínima de la enfermedad (DAS28<3.2). Si el paciente no está dentro de estos rangos el tratamiento se tiene que revisar. Los FAMES más relevantes usados en primera línea son el MTX, la LFN, la SSZ y la hidroxicloroquina, medicamentos bastante conocidos y contrastados que suelen producir pocos efectos adversos (Tabla 11). Los NSAIDs son fármacos complementarios y pueden suministrarse juntamente con FAMES en pacientes con una sintomatología más severa. El AINE más característico es la aspirina que es una sustancia que promueve la producción y liberación de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa favoreciendo la instauración de un ambiente antiinflamatorio y antipirético [435].

Tabla 11. Resumen de los fármacos FAMEs y dosis aplicadas en la AR.

| FAMEs | Dosis | Administración | Efectos Secundarios |
|-----------------------|--|--------------------|---|
| MTX | 10-25mg/semana | Vía oral | Hepatotoxicidad |
| | ¿? | Vía intramolecular | Cirrosis |
| | ¿? | Vía subcutánea | Citopenia, úlcera oral y neumonitis intestinal |
| LFN | 10-20mg/día | Vía oral | Hepatotoxicidad, alteraciones intestinales, diarrea, náuseas e hipertensión |
| SSZ | 2-3gr/día | Vía oral | Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, alteraciones hematológicas |
| Sales de oro | Inicial: 50mg/semana Mantenimiento: 50mg/2-4semanas | Vía intramuscular | Toxicidad cutánea, úlceras bucales y albúmina en orina |
| Penicilamina | 120/240mg/día | Vía oral | Múltiples efectos adversos |
| Antimaláricos: | | | |
| - Cloroquina | 4mg/Kg de peso/día | Vía oral | Toxicidad ocular (retina) |
| - Hidroxicloroquina | 6mg/kg de peso/día | Vía oral | Hiperpigmentación cutánea |
| Ciclosporina A | 2.5mg/kg/día | Vía oral | Hipertensión arterial e insuficiencia renal |

7.1.2. Fármacos biológicos.

Los fármacos biológicos son compuestos sintetizados a partir de organismos vivos (células animales o vegetales, bacterias, virus o levaduras) y actúan sobre dianas específicas del sistema inmunológico como pueden ser ligandos, receptores, etc. Se diseñan en forma de quimeras, proteínas de fusión o anticuerpos recombinantes con el objetivo de inhibir la respuesta inmunitaria y procesos inflamatorios. Este tipo de terapias surgen como alternativa a los FAMEs y se clasifican en tres grupos fundamentales dependiendo del componente inmunológico al que va dirigido. Estos tres grupos son los siguientes: 1) terapias anti-citocinas; 2) terapias anti-células T y, por último, 3) terapias anti-células B.

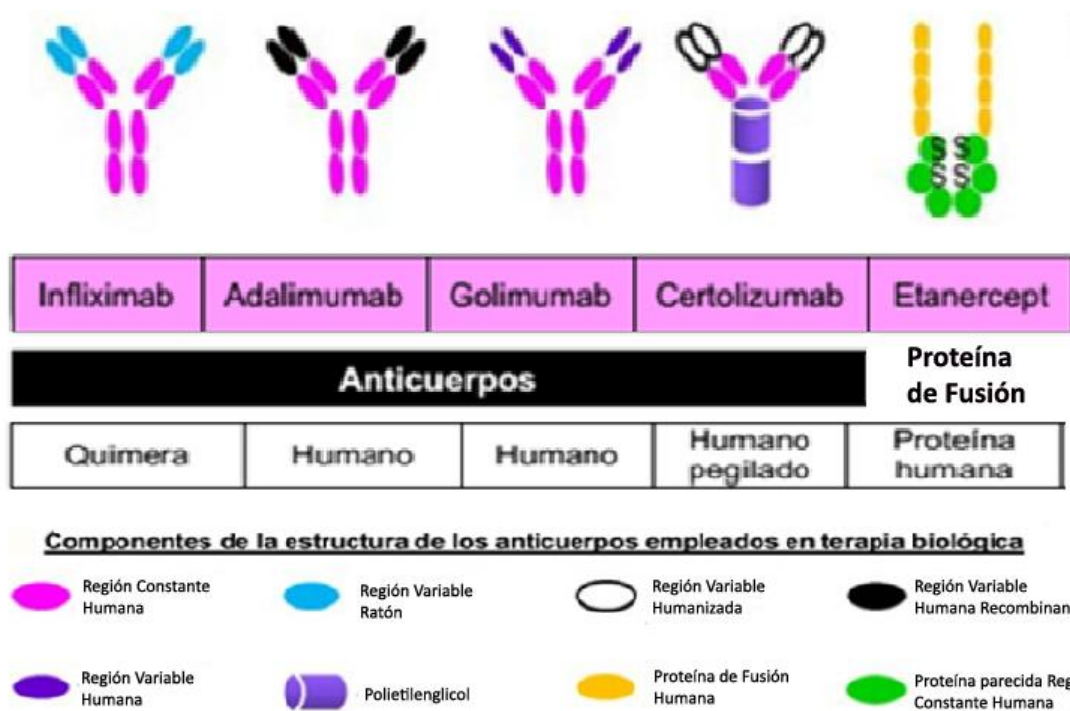
7.1.2.1. Terapias anti-citocinas.

En este grupo los fármacos más utilizados son los dirigidos a bloquear el TNF α que es esencial para la activación, adhesión y migración celular que se traduce en la producción y liberación de diferentes citocinas proinflamatorias, la síntesis de factores catabólicos en el cartílago y MMPs en el tejido sinovial inflamado. Los fármacos biológicos que inhiben el TNF α son el adalimumab, el etanercept, el infliximab, el certolizumab y el golimumab [436] (Figura 25) que se administran con dosis y vías específicas para cada fármaco (Tabla 12):

- **Adalimumab:** es un anticuerpo IgG1 κ humano que se une con gran afinidad al TNF α soluble pero no a la linfotóxina β . Bloquea el TNF α a través de la inhibición de su interacción con los receptores p55 y p75 de la membrana celular reduciendo así la respuesta inmunológica desencadenada por esta citocina e induciendo la apoptosis de linfocitos.
- **Infliximab:** Es un anticuerpo monoclonal quimérico (75% humano que es la región variable y 25% murino, que forma la fracción constante) que se unen con alta afinidad al TNF α soluble y transmembrana y lo inhiben de forma eficaz y en múltiples contextos. Al igual que el adalimumab tampoco tiene efecto sobre la linfotóxina β . Su acción antiinflamatoria en modelos murinos es alta y se ha visto que favorece la cicatrización de las articulaciones erosionadas [28].
- **Etanercept:** Es una proteína de fusión formada por parte del TNFR2 y la fracción Fc de la IgG1 humana. La proteína se une al TNF α y actúa inhibiendo la función efectora del TNF α transmembrana y facilita la destrucción de las células TNF α por citotoxicidad dependiente del complemento. Además, el etanercept promueve la destrucción de células TNF α por citotoxicidad dependiente de anticuerpos y por señalización.
- **Certolizumab:** Es un anticuerpo monoclonal que bloquea directamente a TNF α y, al igual que los fármacos anteriores, neutraliza tanto la forma soluble como la forma transmembrana. Es un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal humanizado conjugado con polietilenglicol que se une y neutraliza el TNF α .
- **Golimumab:** Es un anticuerpo IgG1 κ monoclonal humano creado en ratones genéticamente modificados y que forma un complejo estable con formas bioactivas del TNF α solubles y transmembrana impidiendo la unión a los receptores.

Se ha observado que el bloqueo del TNF α a través de estos fármacos biológicos disminuye drásticamente la sintomatología de los pacientes con AR en un 60-70% y se ha observado que su acción clínica es más eficaz en fases tempranas de la enfermedad.

Figura 25. Tipos de Agentes biológicos usado frente a la AR.



En la imagen se muestra de forma esquemática los diferentes agentes biológicos diseñados por la industria para combatir y reducir la sintomatología en la AR. Todos los agentes biológicos son anticuerpos excepto el etanercept y abatacept que son proteínas de fusión.

Tabla 12. Resumen de las dosis y vía de administración de los fármacos anti-TNF.

| Fármacos anti-TNF | Dosis Habitual | Vía de administración | Efectos Secundarios |
|-------------------|--|-----------------------|---|
| Adalimumab | 40mg/cada 2 semana | Subcutánea | Infecciones oportunistas e insuficiencia cardiaca |
| Infliximab | 3-10mg/kg/peso Infusiones en semana | Intravenosa | Linfoma Enfermedades desmielizantes |
| Etanercept | 25mg/2 veces por semana | Subcutánea | Eritema |
| Abatecept | 10mg/kg | Intravenosa | Hinchazón |
| Certolizumab | Inicial: 400mg por infusión (0, 2 y 4); Mantenimiento: 200mg/cada 2 semana | Subcutánea | Dolor y hemorragias |
| Golimumab | 50mg/mes | Subcutánea | |

7.2. Evaluación de la respuesta a los fármacos anti-TNF en AR.

La respuesta clínica a los diferentes fármacos anti-TNF se evalúa mediante los criterios del EULAR/ACR del 2010 [49], en los cuales se tiene en cuenta el DAS28 de los pacientes al comienzo y a las 24 semanas de tratamiento. Estos criterios también controlan los niveles serológicos de los diferentes autoanticuerpos (FR y anti-CCP), así como los niveles de PCR y la VSG y las erosiones [44]. En base a estos criterios se establecen tres tipos posibles de respuesta: buena o moderada respuesta y fallo

terapéutico (Tabla 13) [49]. Si dependemos de los criterios ACR para clasificación de los pacientes se consideran buenos respondedores aquellos pacientes que presenten al menos un 50-70% de respuesta [437, 438].

Tabla 13. Clasificación de la respuesta en función del DAS28.

| | | Disminución del DAS28 | | |
|--------------|--|-----------------------|--------------------|--------------|
| | | >1.2 | 1.2 - 0.6 | <0.6 |
| DAS28 Actual | | | | |
| <3.2 | | Buena Respuesta | | |
| 3.2 - 5.1 | | | Respuesta Moderada | |
| >5.1 | | | | No Respuesta |

La fila de arriba nos indica la respuesta del DAS28 a las 24 semanas, y la columna de la izquierda los valores clínicos de los pacientes con AR en ese momento. Se realizan a los pacientes las correspondientes pruebas clínicas y físicas y según el coeficiente que obtenga después del tratamiento entra en uno de los tres tipos de respuesta.

7.3. Efectos secundarios y contraindicaciones de los tratamientos anti-TNF.

Los principales efectos adversos observados después de la administración de fármacos anti-TNF son enfermedades oportunistas, como la listeriosis, la aspergilosis, la histoplasmosis y la coccidiomicosis [439]. También se han descrito efectos secundarios más severos como la insuficiencia cardíaca, linfomas y enfermedades desmielinizantes en algunos pacientes [440]. Los efectos más comunes tras la administración de los fármacos son eritema, picor, hemorragias, dolor e hinchazón que suelen desaparecer a los pocos días. El tratamiento con fármacos anti-TNF no se interrumpe con la aparición de infecciones activas, infecciones en prótesis o en pacientes tras una cirugía [441, 442] y está contraindicada la aplicación de vacunas, con la excepción de la vacuna antigripal y la vacuna antineumocócica [443]. Se debe detener el tratamiento durante el embarazo y la lactancia [444].

7.4. Clasificación de la remisión en pacientes con AR.

Además de la clasificación de los pacientes en base a su respuesta terapéutica, es importante tener en cuenta otro grupo clínico denominado “remisión”, en él se incluye a aquellos pacientes que, independientemente del tipo de respuesta farmacológica, presentan una disminución de la actividad patológica. Para ello, la ACR definió inicialmente 6 criterios que incluían la ausencia de rigidez matutina, la ausencia de cansancio, la ausencia de dolor articular en la anamnesis, la ausencia de dolor articular a la presión, la ausencia de tumefacción sinovial y tenosinovial y una VSG normal en un periodo igual o superior a los dos meses desde la administración del fármaco [40]. Para definir estos parámetros se toma como referencia el DAS28 y los puntos de corte son DAS28<1.6 [445] o DAS28<2.6 [446-448]. En 2011, la EULAR y la ACR trabajaron en la actualización de los criterios de remisión [449]. Estos criterios revisados son los más

utilizados actualmente y usan como referencia el SDAI que debe de ser ≤ 3.3 y cumplir las siguientes condiciones:

- SJC ≤ 1 (número de articulaciones inflamadas, *swollen joint count*)
- TJC ≤ 1 (recuento de articulaciones dolorosas, *tender joint count*)
- PCR (mg/dl) ≤ 1
- VGP ≤ 1 (Este criterio es muy restrictivo).

Los criterios aún están en revisión ya que la tecnología y la metodología de diagnóstico están avanzando (Tabla 14). Los investigadores y los especialistas hoy en día piensan que la detección de biomarcadores y los estudios de imagen y radiológicos pueden ser un criterio esencial juntamente con los criterios EULAR/ACR a la hora de clasificar a los pacientes con AR [450-455]. Lillegraven y colaboradores demostraron que los pacientes clasificados en el grupo de remisión según los criterios de la EULAR/ACR seguían presentando daño tisular y una enfermedad activa [454].

Tabla 14. Instrumentos para medir la actividad y la remisión de la enfermedad.

| Instrumento | Punto de corte de la actividad de la enfermedad | |
|--|---|-------------------------|
| Escala de la Actividad del Paciente (PAS) o PASII (rango 0 - 10) | Remisión | 0 - 0.25 |
| | Baja Actividad | > 0.25 - 3.7 |
| | Moderada Actividad | > 3.7 a < 8.0 |
| | Alta Actividad | ≥ 8.0 |
| Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID-3) (rango 0 - 10) | Remisión | 0 - 10 |
| | Baja Actividad | > 1.0 - 2.0 |
| | Moderada Actividad | > 2.0 - 4.0 |
| | Alta Actividad | > 4.0 - 10.0 |
| Clinical Disease Activity Index (CDAI) (rango 0 - 76) | Remisión | ≤ 2.8 |
| | Baja Actividad | > 2.8 – 10.0 |
| | Moderada Actividad | > 10.0 – 22.0 |
| | Alta Actividad | > 22 |
| Disease Activity Score 28 (DAS28) erythrocyte sedimentation rate (ESR) (rango 0 - 9.4) | Remisión | < 2.6 |
| | Baja Actividad | ≥ 2.6 a < 3.2 |
| | Moderada Actividad | ≥ 3.2 a ≤ 5.1 |
| | Alta Actividad | > 5.1 |
| Simplified Disease Activity Index (SDAI) (rango 0 - 86) | Remisión | ≤ 3.3 |
| | Baja Actividad | > 3.3 a ≤ 11.0 |
| | Moderada Actividad | > 11.0 a ≤ 26 |
| | Alta Actividad | > 26 |

Justificación



El diagnóstico de la AR es complicado, debido a que es una enfermedad multifactorial donde intervienen componentes genéticos, hormonales, y ambientales. Se ha calculado que la heredabilidad en la AR está en torno al 60%, lo que otorga a la genética un peso específico relevante en el control de la enfermedad. En las últimas décadas, estudios exhaustivos a nivel molecular y genético han identificado una gran cantidad de variantes genéticas asociadas no solo con el riesgo a desarrollar la enfermedad sino, además, con la respuesta terapéutica frente a FAMEs o fármacos biológicos (fundamentalmente anti-TNF) y la aparición de erosiones óseas como signo de progresión clínica. Sin embargo, a pesar de estos importantes avances, la aplicación de los hallazgos genéticos en la práctica clínica queda todavía lejos, probablemente porque los análisis genéticos realizados hasta la fecha no se integran suficientemente con variables clínicas. Resulta, por tanto, esencial realizar estudios genéticos en poblaciones de pacientes bien caracterizadas clínicamente que nos permitan desglosar las bases genéticas de fenotipos más específicos y complejos.

En este contexto, nuestro grupo de investigación creó en 2019 el consorcio REpAIR que incluye pacientes de AR de 7 países de Europa y cuenta entre ellos, con pacientes de 2 registros europeos bien caracterizados fenotípicamente (DANBIO y DREAM). Los trabajos desarrollados bajo el paraguas de REpAIR se han realizado con la intención de identificar nuevas variantes genéticas implicadas en el desarrollo de la enfermedad y en el fracaso terapéutico y la progresión, a la novedad de la estratificación de los análisis genéticos de acuerdo a un buen número de parámetros clínicos y la integración de datos clínicos y genéticos para la creación de modelos predictivos.

Pensamos que esta estrategia nos podría ayudar a crear en un futuro herramientas terapéuticas individualizadas y adaptadas al perfil genético de cada paciente, lo que probablemente nos permitiría controlar mejor la enfermedad y conseguir una mejor respuesta clínica global. Además, pensamos que el análisis estratificado por diferentes factores clínicos como, por ejemplo, los autoanticuerpos (FR y anti-CCP), nos podría ayudar a entender mejor la base genética de la enfermedad, pero también el dimorfismo sexual existente en AR y las diferencias de pronóstico observadas entre hombres y mujeres.

Objetivos



El objetivo principal de esta tesis es estudiar los factores genéticos implicados en determinar el riesgo a desarrollar la AR y definir los marcadores que influyen en la respuesta a los diferentes tratamientos con fármacos anti-TNF y la progresión de la enfermedad, definida por la presencia de erosiones óseas. El objetivo último consiste en diseñar modelos predictivos que nos permitan predecir el riesgo a desarrollar AR y, lo que es más importante, la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad en pacientes ya diagnosticados en base a su perfil genético.

Los objetivos específicos de la tesis fueron los siguientes:

- Analizar el papel de los polimorfismos relacionados con el transporte, metabolismo y señalización de las hormonas esteroideas en la determinación del riesgo a desarrollar AR y la respuesta a fármacos anti-TNF y la progresión de la enfermedad.

Artículo 1. Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients.

Luz M. Canet, Jose M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Ana Rodríguez Ramos, Carmen B. Lupiañez, Helena Canhão, Manuel Martínez-Bueno, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Signe B Sorensen, Merete L Hetland, María José Soto-Pino, Miguel A. Ferrer, Antonio García, Bente Glintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Alfonso González-Utrilla, Miguel Ángel López Nevot, Pablo Conesa-Zamor, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Sven Erik Hobe Jacobsen, Eduardo Collantes-Estevez, Luca Quartuccio, Federico Canzian. João E. Fonseca, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen & Juan Sainz. **The Pharmacogenomics Journal. Oct 2018.** <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0057-x>.

Artículo 2. Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REPAIR consortium.

Jose M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Luz Canet¹, Rob ter Horst, Olivier Bakker, Alfons A. den Broeder, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhão, Ana Rodríguez-Ramos, Carmen B. Lupiañez, María José Soto-Pino, Antonio García, Eva Pérez-Pampin, Alfonso González-Utrilla, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Romana T. Netea-Maier, Miguel Ángel Ferrer, Eduardo Collantes-Estevez, Miguel Ángel López Nevot, Yang Li, Manuel Jurado, João E. Fonseca Mihai G. Netea, Marieke J. H. Coenen & Juan Sainz. **Scientific Report. Sep 2019.** <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51255-0>.

- Determinar el impacto de variantes genéticas en la vía de señalización de NFκB sobre el riesgo a desarrollar AR y la modulación de la respuesta a terapias biológicas con fármacos anti-TNF.

Artículo 3. NFκB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium.

Jose Manuel Sánchez-Maldonado, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhã, Rob ter Horst, Sonia Muñoz-Peña, Ana Moñiz-Díez, Ana Rodríguez-Ramos, Alejandro Escudero, Signe B. Sorensen, Merete L. Hetland, Miguel A. Ferrer, Bente Grintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Antonio García, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Svend Erik Hove Jacobsen, Eduardo Collantes, Luca Quartuccio, Mihai G. Netea, Yang Li, João E. Fonseca, Manuel Jurado, Miguel Ángel López-Nevot, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, Rafael Cáliz, & Juan Sainz. **Scientific Report. March 2020.** <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61331-5>.

- Validar la asociación de las variantes genéticas identificadas en estudios GWAS con la respuesta frente a fármacos anti-TNF y arrojar algo de luz sobre los posibles mecanismos biológicos subyacentes a las asociaciones confirmadas.

Artículo 4. Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts.

Jose Manuel Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Miguel Ángel López-Nevot, Antonio José Cabrera-Serrano, Ana Moñiz-Díez, Helena Canhao, Rob Ter Horst, Luca Quartuccio, Signe B Sorensen, Bente Grintborg, Merete L Hetland, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Jerzy Swierkot, Alfons Den Broeder, Salvatore De Vita, Eva Rabling Brix Petersen, Yang Li, Miguel Ángel Ferrer, Alejandro Escudero, Mihai G Netea, Marieke Coenen, Vibeke Andersen, João Eurico Fonseca, Manuel Jurado, Katarzyna Bogunia-Kubik, Eduardo Collantes & Juan Sainz. **Frontiers in Immunology 2021. March 2021 (En revision).**

Material es y Métodos



1. Diseño

Estudio de casos y controles (susceptibilidad) o anidado (respuesta terapéutica) prospectivo y multicéntrico.

2. Centro donde se desempeñó el trabajo

Esta tesis doctoral se ha realizado íntegramente en las instalaciones del centro de genómica GENYO (www.genyo.es). Durante su desarrollo nuestro grupo ha contado con la estrecha colaboración con todos los centros clínicos y de investigación que forman parte del consorcio REpAIR. En particular, queremos destacar el papel que han desarrollado las secciones de Reumatología e Inmunología (HLA) del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (HUVN). El trabajo presentado en esta tesis ha sido posible gracias al trabajo y compromiso desinteresado de todos los miembros de los centros clínicos y de investigación participantes.

3. Sujetos de estudio

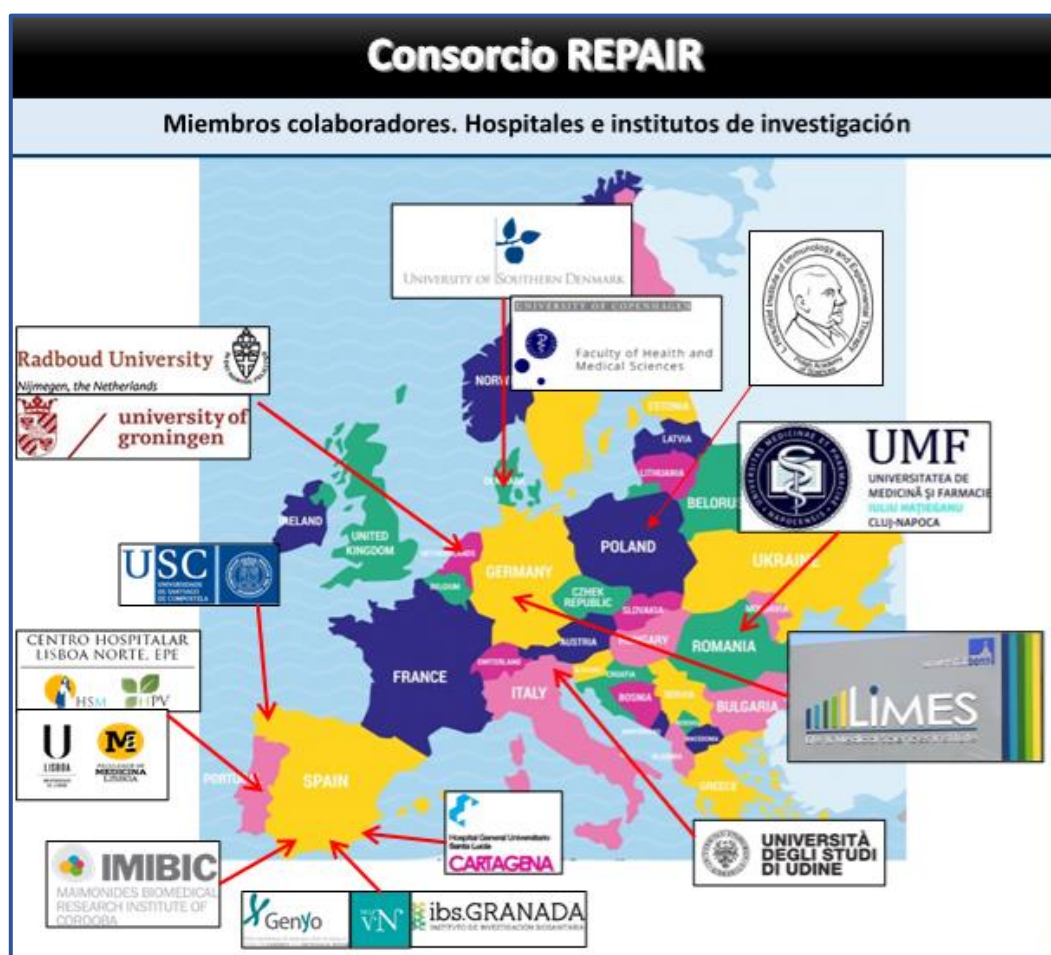
Los individuos incluidos en este estudio son pacientes con AR que han sido diagnosticados de AR de acuerdo con los criterios establecidos por el grupo cooperativo ACR/EULAR en 2011. La mayor parte de los pacientes se encuentran en una fase crónica de la enfermedad y han sido tratados con fármacos anti-TNF como primera línea de tratamiento biológico, según el consenso de la Sociedad Española de Reumatología (www.ser.es).

4. Población de estudio

La población de estudio incluyó 5769 individuos caucásicos de los cuales 3624 son paciente con AR y 2145 controles sanos reclutados en el contexto del consorcio REpAIR (Figura 26). Todos los individuos dieron su consentimiento para su inclusión en el estudio mediante firma del correspondiente consentimiento informado, según las directrices marcadas por el Biobanco de Andalucía y los comités de ética de todos los centros participantes. Todos los pacientes fueron diagnosticados atendiendo a los criterios de 1987 del ACR [41] y los publicados más recientemente en el 2011 por ACR/EULAR. Todos los pacientes que han sido incluidos en los análisis estadísticos de asociación comenzaron el tratamiento de su enfermedad entre los años 2004 y 2016 [49]. La población de estudio incluyó pacientes de varios países europeos distribuidos de la siguiente forma: 742 individuos fueron reclutados en el Hospital Universitario Virgen de la Nieves de Granada, el Hospital Reina Sofía de Córdoba, el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y el Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena; 1016 controles sanos (donantes de sangre) que fueron proporcionados por el Centro Regional de transfusión de Sangre de Granada y Almería (CRTS) y el Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena; 46 pacientes y 25 controles del Hospital Clínico

de Reumatología de la Universidad de Údine (Italia); 817 pacientes y 201 controles sanos del Hospital Santa Maria (CHLN) y el Biobanco-IMM de Lisboa (Portugal); 87 casos y 105 controles sanos de la Universidad de Medicina y Farmacia de 'Iuliu Hatieganu' de Cluj-Napoca (Rumanía); 271 pacientes del Instituto de Inmunología y Terapia Experimental Hirsfeld (Polonia); y dos registros europeos, DANBIO Y DREAM. El registro DANBIO estaba constituido por 779 casos de AR y 978 controles sanos, mientras que el registro DREAM incluyó 882 pacientes de AR. Este último registro holandés dispone de datos de GWAS con información de 2.557.253 SNPs y un amplio número de variables clínicas que definen la respuesta terapéutica y la evolución de los pacientes [456]. El número de casos de AR y controles incluidos en los diferentes estudios varía debido a la evolución del reclutamiento a lo largo de los años que ha durado este proyecto.

Figura 26. Esquema de todos los miembros colaboradores del consorcio REPAIR.



4.1. Población de estudio según el tratamiento anti-TNF.

La población del consorcio REPAIR en el tiempo en que se desarrollaron los estudios incluidos en esta tesis consistió en 1963 pacientes con AR tratados en su mayoría con fármacos anti-TNF en primera línea (infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab) y 1347 controles sanos.

4.1.1. Población de estudio REpAIR: pacientes tratados con anti-TNF

En la población REpAIR se incluyeron un total de 841 pacientes que fueron tratados al menos con un fármaco anti-TNF. Dichos pacientes se clasificaron en base a la respuesta terapéutica en respondedores (n=312, 39%), moderados respondedores (n=381, 47%) y no respondedores (n=113, 14%) de acuerdo con los criterios de respuesta establecidos por la EULAR [49]. De estos pacientes, 274 provenían del Hospital Universitario Virgen de la Nieves de Granada, del Hospital Reina Sofía de Córdoba, del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y del Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena. Ciento sesenta y tres pacientes fueron reclutados en el Hospital Santa María (CHLN) y el Biobanco-IMM de Lisboa (Portugal), 87 pacientes de la Universidad de Medicina y Farmacia de Iuliu Hatieganu en Cluj-Napoca (Rumanía), 46 pacientes en el Hospital Clínico de Reumatología de la Universidad de Údine (Italia) y 271 pacientes del Instituto de Inmunología y Terapia Experimental Hirsfeld (Polonia).

La inclusión de los pacientes en el consorcio REpAIR y el uso de sus muestras biológicas en los estudios genéticos propuestos en esta tesis fue aprobada por los comités éticos de las diferentes instituciones participantes y cada paciente firmó un consentimiento informado.

4.1.2. Población de replicación para individuos tratados con anti-TNF

La población de replicación se constituyó con los pacientes de AR de dos registros europeos independientes. El registro DREAM (*Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring registry*) compuesto por 882 casos holandeses de AR tratados con fármacos anti-TNF y el registro danés DANBIO (*The National Danish Registry for Biological Treatment of Rheumatic Disease*) que incluía 695 pacientes de AR (555 de los cuales fueron tratados con terapias biológicas anti-TNF) y 978 controles sanos.

Al igual que en la población REpAIR, la inclusión de los registros en los estudios genéticos fue aprobada por los respectivos comités científico-técnicos que son el *Institutional review board of the Radboud University Medical Center* y el *Regional Ethics Committee of Central Denmark Region* (códigos M-20100153 y S-20120113).

4.1.3. Criterios de admisión en los estudios genéticos

Para poder admitir a los pacientes en los estudios genéticos se establecieron los siguientes criterios: 1) Origen caucásico; 2) Diagnóstico de AR según los criterios internacionales standard de la ACR/EULAR; 3) Seguimiento de la enfermedad por un tiempo mínimo de 24 semanas; 4) Disponibilidad de los valores basales y a 6 meses de DAS28 y, finalmente, 5) Registro de datos clínicos de acuerdo a la base de datos de REpAIR que incluyen las siguientes variables: edad, sexo, país de origen, etnia, fecha de nacimiento, fecha de exitus, año de diagnóstico, tiempo de seguimiento, DMARDs, corticoides, fármacos biológicos, DAS28 basal, DAS28 tras las 24 semanas de

tratamiento con el primer fármaco biológico, anti-CCP, FR, número de tratamientos biológicos erosiones óseas y respuesta global de acuerdo a los criterios EULAR.

5. Selección de los SNP del estudio.

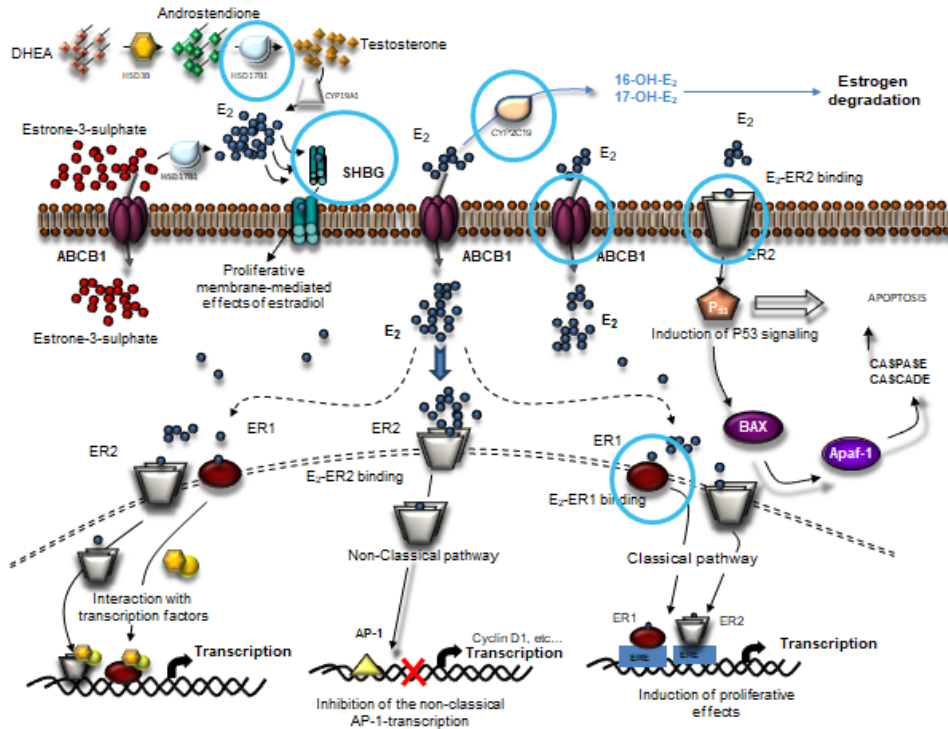
La selección de los marcadores genéticos se realizó para cada caso teniendo en cuenta las hipótesis de partida que sugerían que tanto las hormonas esteroideas como la ruta del NFκB podían jugar un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad, así como en la respuesta terapéutica y la aparición de enfermedad erosiva (erosiones óseas). Además, para el estudio de validación se seleccionaron los marcadores genéticos asociados con la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF en estudios de GWAS. En todos los casos la selección de los marcadores genéticos se realizó teniendo presente los siguientes parámetros:

- Previas asociaciones descritas en estudios de genes candidato o GWAS. Para conocer los estudios publicados se realizó una búsqueda exhaustiva en el NCBI (www.pubmed.com) y se realizó una selección de genes implicados en el reconocimiento de las hormonas esteroideas (receptores), así como los genes implicados en la señalización y metabolismo de estas (Figura 27). Además, se seleccionaron genes en la ruta de NFκB (Figura 28) y de estudios GWAS de respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF en AR.
- Valores de desequilibrio de unión (Linkage disequilibrium, LD) ≥ 0.6 .
- Su potencial funcionalidad de acuerdo con las bases de datos públicas como haploreg o regulome y considerando factores como la metilación, expresión génica (eQTL), alteración del estado de la cromatina, unión a factores de transcripción y alteración de motivos reguladores, entre otros parámetros.

En el primer trabajo titulado *Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients*, se analizaron 47 variantes en 16 genes implicados en la señalización, transporte y metabolismo de hormonas esteroideas (*ABCB1*, *SHBG*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *NR1/2*, *HSD17B1*, *CYP1B1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP17A1*, *SULT1A1* y *GSTP1*) (Figura 27).

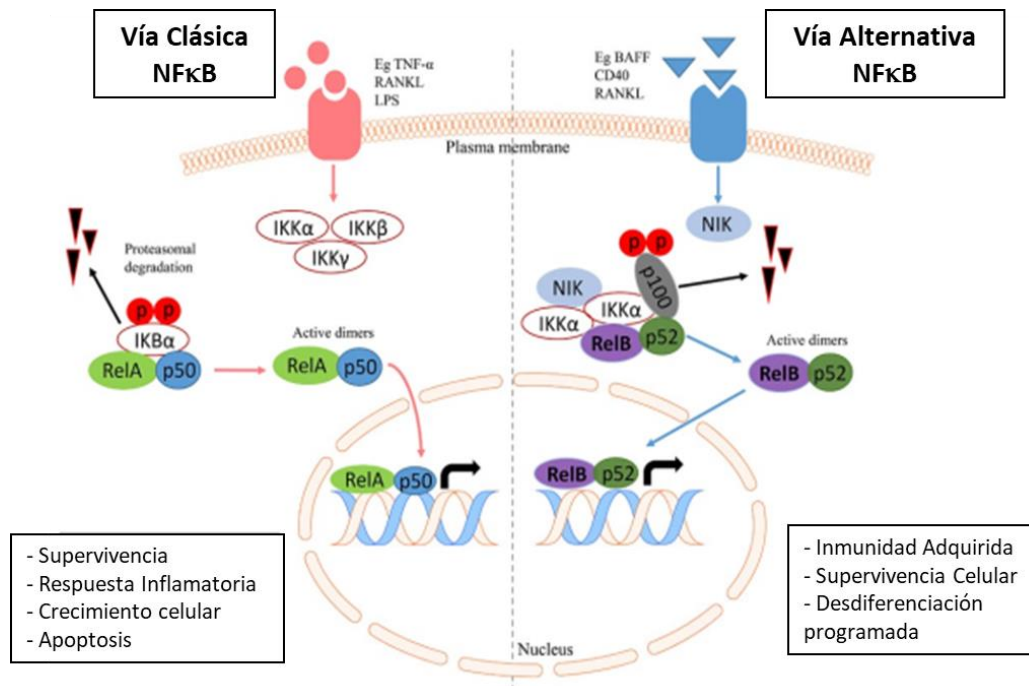
En el segundo trabajo titulado *Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REpAIR consortium*, se analizaron 41 polimorfismos en 17 genes relacionados con las hormonas esteroideas, pero además con los receptores Fc (*FcγR3A*, *FcγR2A*, *SHBG*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *NR1/2*, *HSD17B1*, *CYP1B1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP17A1*, *SULT1A1* y *GSTP1*) (Figura 27).

Figura 27. Selección de los genes relacionados con las rutas de señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas.



En el tercer trabajo titulado *NFκB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REpAIR consortium* se estudiaron 28 SNPs en 18 genes relacionados con la vía del NFκB (*NFκB1*, *NFκB2*, *REL*, *RELA*, *RELB*, *IRF4*, *GBP*, *IKKBK*, *KLRC1*, *KLRC1|KLRC4*, *NFκB2|PSD*, *NFκBIB*, *NLRP3*, *TLR10*, *TLR4*, *TRL5*, *TLR9|TWF2* y *TRAF1|C5*) (Figura 28).

Figura 28. Selección de los genes relacionados con la vía NFκB.



Finalmente, en el cuarto estudio titulado *Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts* se analizaron 28 variantes genéticas previamente identificadas en estudios de GWAS para respuesta con fármacos anti-TNF en 25 genes (*ALPL, CNTN5, CREBBP, CST2, HSPEP1|MAF, IFNK|C9orf72, LASS6, LINC01387, LMO4|PKN2, C9orf47, CBLN2, LINC02549, ETV1, LINC00924, MAP2K6|KCNJ16, NUBPL, OR5BP1P|LRRC55, PDZD2, PLA2G4A|FDPSL1, PPP1R9A|PON1, QKI, CENTD1, SLCO1C1, TEC* y *TRMT112P5*).

6. Muestras biológicas y base de datos clínica

Tras la firma del consentimiento informado, se recogió para cada paciente una muestra de sangre periférica y una serie de datos clínicos incluidos en la base de datos REpAIR. Como hemos mencionado con anterioridad las variables recogidas en la base de datos incluían: edad, sexo, país de origen, etnia, fecha de nacimiento, fecha de exitus, año de diagnóstico, tiempo de seguimiento, DMARDs, corticoides, fármacos biológicos, DAS28 basal, DAS28 tras las 24 semanas de tratamiento con el primer fármaco biológico, anti-CCP, FR, número de tratamientos biológicos, erosiones óseas y respuesta global de acuerdo a los criterios EULAR. El valor basal y a las 24 semanas del DAS28 se recogió de acuerdo a los estándares de calidad y que incluye el análisis de 28 articulaciones (hombros, codos, carpos, metacarpofalángicas, Interfalángicas proximales y rodillas) que son revisadas en sucesivas visitas médicas. También se midieron los valores de la velocidad de sedimentación globular (VSG) y se determinaron los valores de la evaluación global del paciente mediante una escala visual analógica (0-100 mm). Con estos 4 parámetros y aplicando la fórmula del DAS 28 ($0.56 \text{ NAD } 28 + \text{ NAT}28 + 0.71\text{g VSG} + 0.014 \text{ EGP}$) se obtuvo el nivel de actividad de la enfermedad y se determinó el tratamiento más adecuado para cada caso.

Los criterios que tienen en cuenta los especialistas son los siguientes:

- Enfermedad poco activa: < 3.2
- Enfermedad moderadamente activa: 3.3 – 5.1.
- Enfermedad muy activa: > 5.1.

El valor inicial o basal (semana 0) se tomó como valor de referencia para cada paciente con AR y se revisaron los valores clínicos a las 12 y 24 semanas. Al comparar el valor basal y el obtenido en las revisiones periódicas se pudo obtener el cambio global del DAS28 y determinar si existió respuesta a la terapia biológica suministrada.

- Respuesta buena: 1.2
- Respuesta moderada: 0.6 – 1.2.
- Respuesta nula: < 0.6.

7. Extracción del material genético y determinación del factor reumatoide y los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados.

El ADN genómico de casos y controles sanos fue extraído de PBMCs a partir de muestras de sangre periférica utilizando los robots GenoVision M-48 (Quiagen, Venlo, The Netherlands) y Maxwell® 16 Instrument (Cat.# AS3050) y los kits MagAttract DNA Blood Mini M48 kit (192) y Qiamp Blood DNA Mini kit de Qiagen® (Qiagen, Valencia, CA, USA) o el kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification System de Maxwell®.

La determinación del factor reumatoideo y los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados que se usan para determinar el grado de severidad de la AR se realizó mediante equipos automatizado (ROCHE) en las secciones de Bioquímica Clínica y Autoinmunidad del Hospital Universitario Virgen de las Nieves mediante Kit de ELISA.

8. Genotipado de las variantes genéticas seleccionadas.

El genotipado de los polimorfismos genéticos de interés se realizó mediante sondas KASPar™ (KASPar™ genotyping technology, LGC Genomics, KBioscience, London, UK) y sondas TaqMan (Taqman® SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), dos tecnologías sobradamente contrastadas en términos de calidad de genotipado. Los protocolos utilizados en la PCR fueron los recomendados por los fabricantes para placas en formato de 384 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las placas de 384 se generaron a partir de muestras de ADN distribuidas en 4 palcas de 96 pocillos siguiendo un esquema en “Z” y dejando 8 pocillos como controles negativos (sin material biológico) que fueron identificados como NTCs (non-template controls). La distribución de ADN en las placas 384 a partir de las placas de 96 se realizó de forma automática con el robot de pipeteo Versette® (Versette™ Automated Liquid Handler) que tiene unas elevadas prestaciones y garantiza una dispensación del material biológico altamente precisa. Tras la PCR, los productos de la PCR fueron analizados con el aparato ABI Prism 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems). Este programa usa un avanzado algoritmo de multicomponentes para calcular la señal con la que se ha marcado cada alelo midiendo la fluorescencia para cada muestra durante la lectura. El sistema de análisis genera una imagen gráfica de los resultados permitiendo que, de manera automática, detectemos los genotipos y podamos interpretar correctamente los resultados de la PCR. En la figura 29 podemos observar un ejemplo de los resultados obtenidos en una de las placas analizadas en los estudios descritos en la tesis. Con la intención de garantizar la calidad de los resultados, alrededor del 5% de las muestras de ADN se incluyeron por duplicado y se comprobó en cada caso que la duplicidad de genotipos era superior al 99%.

9. Pruebas estadísticas.

9.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Con la intención de comprobar la estabilidad de las proporciones genotípicas observadas en la población de estudio, determinamos el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en la población de controles sanos mediante una prueba de chi-cuadrado (χ^2). Los marcadores genéticos con un valor de HWE inferior a 0.001 fueron excluidos de los análisis estadísticos. El límite de significación se estableció en 0.001 considerando el número de marcadores analizados en cada estudio.

9.2. Análisis de asociación.

La asociación entre los polimorfismos analizados en cada estudio y el fenotipo de interés (riesgo a desarrollar AR, respuesta terapéutica o presencia de erosiones óseas como signo de progresión) se determinó mediante regresión logística o lineal ajustada por los factores confundentes identificados en cada caso.

La regresión logística se empleó para los análisis de asociación con fenotipos dicotómicos que en nuestro caso fueron utilizados en el análisis de riesgo de AR (caso o control), en el análisis de la respuesta terapéutica (respuesta o no respuesta) según los criterios EULAR (respondedores y no respondedores) y el análisis de progresión definido por la presencia o ausencia de erosiones óseas (enfermedad erosiva y no erosiva). La regresión lineal fue utilizada para el análisis de respuesta terapéutica definida como cambios absolutos en el valor del DAS28 basal y a las 24 semanas. El valor de DAS28 se escala entre 0 y 10.

Los análisis estadísticos fueron realizados usando dos programas estadísticos simultáneamente, el SPSS (v.22) y el STATA (v.12). La significación estadística global se estableció para cada estudio atendiendo al número de polimorfismos analizados, pero, además, considerando el número de modelos de herencia analizados (log-aditivo, dominante y recesivo). Las asociaciones que sobrevivieron la corrección por múltiples comparaciones se consideraron estadísticamente significativas. Para determinar el número de polimorfismos independientes se utilizó el método de Meff [457] que considera los valores de desequilibrio de unión entre las variantes analizadas y la posible colinealidad entre variantes genéticas de diferentes cromosomas.

9.3. Análisis del poder estadístico

Para el diseño de los estudios genéticos incluidos en esta tesis se realizó un análisis previo del poder estadístico (80%) para detectar asociaciones. El análisis se realizó con el programa Quanto® (<http://hydra.usc.edu/gxe/>), que nos permite averiguar por adelantado la OR que podremos alcanzar en nuestros estudios considerando el tamaño poblacional disponible, el riesgo del fenotipo estudiado (por ejemplo, 1% para el riesgo a desarrollar AR), la frecuencia del alelo menor para el marcador genético analizado

(0.25) y el valor de significación escogido en función de número de comparaciones múltiples realizadas. Este análisis resulta esencial para el correcto diseño de los estudios de base poblacional y nos mostró sistemáticamente la idoneidad de la población REpAIR y los registros DREAM y DANBIO para la realización de estudios genéticos.

9.4. Meta-análisis.

Con la intención de determinar el efecto global de un marcador sobre el fenotipo estudiado, bien sea el riesgo a desarrollar AR, la respuesta terapéutica o la progresión de la enfermedad, se realizó siempre que fue posible el meta-análisis entre la población de estudio y la población o poblaciones de replicación. El método elegido para los meta-análisis fue, generalmente, el método *random* (azar) que asume que el efecto del marcador genético puede ser diferente en las diferentes poblaciones de estudio. Sin embargo, esta aproximación en genética no siempre es la más adecuada ya que se puede presuponer que si el marcador asocia con el fenotipo es por su papel biológico y funcional que podemos asumir que será similar en diferentes poblaciones de sujetos caucásicos de origen europeo. Por este motivo, en ocasiones, se utilizó el modelo *fixed* (fijo) que asume un papel funcional del marcador analizado. A pesar de estas opciones nuestros datos fueron consistentes independientemente del modelo utilizado. La heterogeneidad de las poblaciones analizadas en cada meta-análisis se determinó con el estadístico I^2 . Este parámetro de control está relacionado exclusivamente con la heterogeneidad del análisis estadístico, no con las características intrínseca de cada población de estudio incluida en el meta-análisis, las cuales se consideran homogéneas gracias a estudios estadísticos anteriores y por ello se pueden integrar en el análisis. Un valor de P de heterogeneidad menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo, es decir, no hay diferencias entre las poblaciones analizadas en el meta-análisis y las diferencias estadísticas obtenidas se debe en exclusiva a la variable genética de estudio.

9.5. Análisis de haplotipos.

Cuando el estudio incluía marcadores independientes ($r^2 < 0.6-0.8$) en genes de un mismo gen o región cromosómica se realizó un análisis de haplotipos para detectar posibles asociaciones guiadas por más de un marcador genético. Los análisis de haplotipos se realizaron con el SNPStats (<https://www.snptest.net/start.htm>) y en R con el script Haplo.stats. Los análisis fueron siempre ajustados por edad, sexo y país de origen y posibles factores confundentes deducidos y seleccionados del análisis estadístico de los parámetros clínicos de las poblaciones de estudio. Las frecuencias de los haplotipos se determinaron mediante el algoritmo EM (*Expectation-maximization*) de manera que el haplotipo más común fue usado como referencia en el análisis de asociación. Haplotipos con una frecuencia igual o superior a 0.01 fueron incluidos en los análisis. La reconstrucción de los haplotipos se calculó mediante las herramientas SNPTools [458] y Haploview (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) y

los bloques de LD (*linkage disequilibrium*) se representaron gráficamente por medio de los valores de r^2 y de acuerdo al método de Gabriel y colaboradores (2002) [459].

9.6. Análisis eQTL e *in silico* de la funcionalidad de los SNPs.

Para la selección de los marcadores genéticos analizados en cada uno de los estudios de genes candidato desarrollados en esta tesis, además de considerar la asociación con los fenotipos de interés en trabajos publicados en la literatura, se tuvo en cuenta su posible papel funcional. Para ello, analizamos el impacto biológico de los marcadores atendiendo a la información proporcionada por bases de datos públicas como Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) y ENCODE (<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/>), pero, además, bases de datos de expresión génica como GTEx portal (<http://www.gtexportal.org/home/>) o el blood eQTL browser (<http://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>) para sangre periférica y diferentes tejidos.

9.7. Análisis de modelos predictivos.

Con la intención de utilizar los resultados genéticos obtenidos para mejorar la predicción del desarrollo de la enfermedad y la respuesta terapéutica o la progresión, construimos modelos genéticos predictivos mediante regresión logística por pasos hacia adelante (*stepwise logistic regression*).

Mediante esta técnica estadística creamos un modelo de referencia con parámetros demográficos y clínicos como la edad, el género y el FR que comparamos con un modelo predictivo con estos mismos parámetros, pero, además, los marcadores genéticos de interés, es decir, los asociados o bien con el riesgo a desarrollar AR o la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad. Tras la inclusión de las variables genéticas de interés conservamos todos aquellos parámetros genéticos que son significativos en el modelo a un nivel de asociación de $P \leq 0.10$. Las variables demográficas y clínicas permanecen en el modelo independientemente de su nivel de significación. Una vez construido el modelo vamos eliminando la variable genética con el mayor valor de P en cada paso y continuamos eliminando variables hasta que todas ellas son significativas a un nivel de asociación de $P < 0.05$. En ese momento consideramos definido el modelo genético y realizamos el análisis de la curva ROC y obtenemos el valor de OR e intervalo de confianza para cada modelo. Para comparar la capacidad predictiva del modelo genético en relación al modelo demográfico y clínico de referencia, realizamos el test LR (likelihood ratio test) o test de verosimilitudes que nos indica si ambos modelos pueden ser considerados estadísticamente diferentes. Finalmente, y con el objeto de comprobar que el resultado obtenido en el análisis no era producto del azar, realizamos una construcción aleatoria de 50.000 modelos alternativos (test de permutaciones) y buscamos si alguno de esos modelos superaba la capacidad predictiva del modelo genético. En caso negativo podemos confirmar que el modelo genético construido predice de forma eficiente el fenotipo analizado. En el actual contexto clínico, el desarrollo de modelos genéticos predictivos eficaces puede constituir una herramienta

útil y fiable para predecir el riesgo a desarrollar AR y, lo que es probablemente más importante, el riesgo al fracaso terapéutico y la progresión de la enfermedad.

Figura 29. Esquema del procedimiento usado en los materiales y métodos.



- Análisis de Genotipado-Programa SDS v.2.4.
- Análisis estadístico (SPSS, SATA, ...).
 - Equilibrio Hardy-Weinberg (prueba chi-cuadrado)
 - Riesgo: Regresión Logística ajustada por sexo, edad y país de origen;
 - Respuesta a fármacos anti-TNF: Regresión Lineal ajustada por sexo, edad y país de origen; Regresión Logística ajustada por sexo, edad y país de origen.
 - Progresión (Definida por la aparición de erosiones) ajustada por sexo, edad y país de origen.
 - Análisis estratificado por género, estatus FR y años de evolución de la enfermedad.
 - Poder estadístico (Programa Quanto)
 - Análisis de Haplotipos.
 - Corrección con el test de comparaciones múltiples.
- Meta-análisis (Modelo Fijo o Modelo *Random*).
- Modelos predictivos (regresión logística paso a paso).

10. Ensayos de análisis funcionales de SNPs relacionadas con las hormonas esteroideas.

Con el objetivo de determinar si las asociaciones entre los polimorfismos genéticos seleccionados en cada estudio y el riesgo a desarrollar AR o la respuesta terapéutica y la progresión de la enfermedad tenían una base biológica, realizamos una batería de ensayos funcionales que consistieron en ensayos de estimulación de citocinas (IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, TNF α , IL17 e IL22) en sangre completa, PBMCs o macrófagos derivados de monocitos con diferentes agentes estimulantes del sistema inmunitario entre los que se seleccionaron el lipopolisacárido (LPS; 1 o 100 ng/mL), la fitohematoglutinina (PHA; 10 μ g/mL), el Pam3Cys (10 μ g/mL), el CpG (ODN M362; 10 μ g/ml) y bacterias de la microbiota intestinal como *Borrelia burgdorferi* y *Escherichia coli* por su capacidad de modular la respuesta inmunológica (Figura 30).

Los análisis funcionales se realizaron en el contexto del *Human Functional Genomic Project* (HFGP, <http://www.humanfunctionalgenomics.org/>) que cuenta con la cohorte 500FG que incluye 531 individuos sanos que han sido analizados genéticamente con tecnología GWAS [460-462]. Entre los 531 sujetos de la cohorte 500FG, contamos con datos de los ensayos de estimulación en un total de 408 individuos. Para el análisis de correlación de los datos de expresión de citocinas (cQTL), los datos se transformaron a fase logarítmica y se analizaron mediante regresión lineal ajustada por edad y sexo utilizando un script en R (<http://www.r-project.org/>). Con el objetivo de poder corregir los análisis estadísticos por las múltiples comparaciones realizadas se estableció un nivel de significación para cada estudio que tuvo en cuenta el número de marcadores genéticos analizados y el número de citoquinas analizadas, pero además el número de agentes estimulantes utilizados y los modelos de herencia analizados. Aunque esta aproximación resulta muy restrictiva en términos estadísticos, consideramos necesario establecer con exactitud el nivel de significación, aunque éste no descarte una función biológica real de los SNPs con efectos biológicos destacables.

El protocolo utilizado para estos ensayos de estimulación en sangre completa, PBMCs y macrófagos derivados de monocitos ha sido descrito en detalle previamente [460-462]. No obstante, se describen brevemente a continuación. Los PBMCs se lavaron dos veces en solución salina y se suspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con gentamicina (10 mg / mL), L-glutamina (10 mM) y piruvato (10 mM). Los ensayos de estimulación de los PBMCs se realizó en placas Grenier de 96 pocillos de fondo redondo a una densidad de $5 \cdot 10^5$ células por pocillo durante un periodo de 24 horas en presencia de suero humano reconstituido al 10% e incubados a 37°C y 5% de CO $_2$. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20°C hasta su uso para la determinación de los niveles de citocinas por ELISA (PeliKine Compact, Amsterdam, o R&D Systems). Para los experimentos de estimulación en sangre completa se utilizaron 100 μ L de sangre heparinizada que se agregó a una placa de 48 pocillos y posteriormente se estimuló con 400 μ L de LPS y PHA (volumen final 500 μ L) durante

48 horas a 37 ° C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -20 ° C hasta la determinación de los niveles de citocinas por ELISA siguiendo las pautas técnicas recomendadas por el fabricante [460, 462, 463].

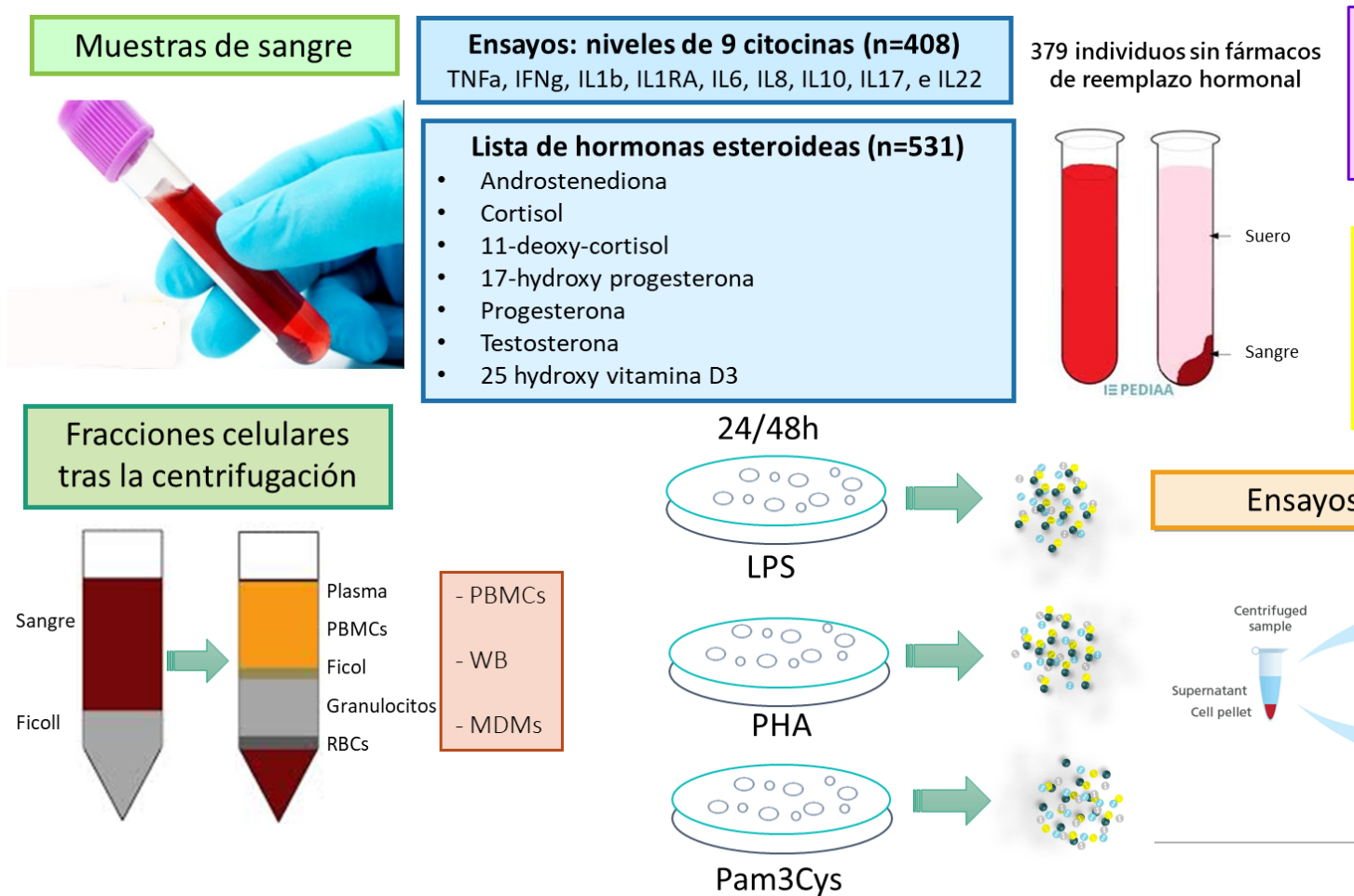
11. Determinación de los niveles serológicos de hormonas esteroideas.

Con el objetivo de poder establecer si el efecto de los polimorfismos analizados podían mediar su efecto sobre el riesgo a desarrollar AR o la respuesta terapéutica y la progresión a través de las hormonas esteroideas, decidimos analizar la correlación de los marcadores genéticos más destacados con los niveles de 7 hormonas esteroideas (la androstendiona, cortisol, 11-deoxicortisol, 17-hidroxi-progesterona, progesterona, testosterona y 25-hidroxi-vitamina D3) en suero de 531 donadores de la cohorte 500FG del HFGP [462] (Figura 30). Tras la transformación de los datos a escala logarítmica se analizó la correlación de los SNPs con los niveles hormonales por regresión lineal ajustada por edad y género. Se excluyeron de los análisis estadísticos los donantes sanos que tomaron suplementos hormonales o estaban bajo terapia hormonal sustitutiva en el momento de la colección de la muestra de suero. Un total de 379 individuos fueron finalmente incluidos en los análisis, 107 mujeres y 272 hombres.

Los niveles hormonales se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS) que es el método más adecuado para determinar los niveles hormonales ya que combina el poder de separación del HPLC con la selectividad y la sensibilidad de la determinación de peso molecular de la espectrofotometría de masas lo que garantiza una determinación muy precisa cuantitativa y cualitativamente de las hormonas.

Siguiendo una estrategia similar a los ensayos de cQTL, el nivel de significación estadística se estableció para cada estudio incluido en la tesis atendiendo al número de marcadores genéticos analizados, el número de hormonas determinadas por LC/MS (n=7) y el número de modelos de herencia considerados (n=3; modelos log-aditivo, dominante y recesivo).

Figura 30. Procedimiento usado en los experimentos funcionales.



Abreviaturas: Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs), Sangre Total (WB), y Macrófagos derivados de monocitos (MDMs)

12. Correlación entre los polimorfismos genéticos y 91 subpoblaciones derivadas de la sangre periférica.

Una parte importante de los análisis biológicos incluidos en nuestros estudios consistió en el análisis de correlación entre los marcadores genéticos seleccionados y los niveles de las diferentes células inmunológicas que se encuentran formando parte de la sangre periférica. Este análisis se diseñó con el objetivo de tratar de establecer una posible conexión entre los factores genéticos más destacados en los análisis genéticos y subtipos celulares específicos que pudieran estar implicados en la modulación de la respuesta inmunológica. Para ello, se utilizaron datos de la población 500FG del HFGP [460-462] donde se caracterizaron fenotípicamente 91 poblaciones derivadas de la sangre en un total de 408 individuos sanos (Tabla 15 y Figura 30).

Tabla 15. Los 91 sub tipos celulares analizados en sangre periférica y PBMCs.

| 91 subpoblaciones derivadas de la sangre periférica y PMBCs. | | | |
|--|--|----|---|
| 1 | Leucocitos_CD45P_LMI1 | 38 | CD8P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2 |
| 2 | Neutrophils_LMI1 | 39 | CD8P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2 |
| 3 | Monocitos_CD14P_LMI1 | 40 | CD8P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2 |
| 4 | Monocitos_Clásicos_CD14PPCD16N_LMI1 | 41 | CD8P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2 |
| 5 | Monocitos_Intermedios_CD14PPCD16P_LMI1 | 42 | CD8P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2 |
| 6 | Monocitos_NoClásicos_CD14PCD16P_LMI1 | 43 | CD8P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2 |
| 7 | Limfocitos_LMI1 | 44 | CD8P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2 |
| 8 | Células_T_CD3P_CD56N_LMI1 | 45 | Lymphocytes_LMI3 |
| 9 | Células_NK_CD3N_CD56P_LMI1 | 46 | B_cells_CD3N_CD19P_LMI3 |
| 10 | Células_NKT_CD3P_CD56P_LMI1 | 47 | CD27N_IgMP_LMI3 |
| 11 | Células_B_CD19P_LMI1 | 48 | CD19P_CD20N_Plasma_blasts_LMI3 |
| 12 | CD4P_Células_T_LMI1 | 49 | CD19P_CD20P_Células_B_LMI3 |
| 13 | CD8P_Células_T_LMI1 | 50 | IgDN_CD5PP_LMI3 |
| 14 | DP_CD4P_CD8P_LMI1 | 51 | IgDP_CD5PP_LMI3 |
| 15 | DN_CD4N_CD8N_LMI1 | 52 | IgDN_CD5P_LMI3 |
| 16 | CD4P_CD25high_Treg_LMI1 | 53 | IgDP_CD5P_LMI3 |
| 17 | NK_dim_CD56P_CD16P_LMI1 | 54 | CD24P_CD38P_LMI3 |
| 18 | NK_bright_CD56PP_CD16N_LMI1 | 55 | Células_B Transicional_CD24PP_CD38PP_LMI3 |
| 19 | NK_CD56P_CD16N_LMI1 | 56 | IgDN_IgMP_LMI3 |
| 20 | Leucocitos_CD45P_LMI2 | 57 | IgDP_IgMP_LMI3 |
| 21 | Células_T_CD3P_CD56N_LMI2 | 58 | IgDP_IgMN_LMI3 |
| 22 | CD4P_Células_T_LMI2 | 59 | IgDN_IgMN_LMI3 |
| 23 | CD8P_Células_T_LMI2 | 60 | Células_B Transicional_CD27N_IgMP_CD24P_CD38high_LMI3 |
| 24 | CD45RON_CD45RAP_Células_T_LMI2 | 61 | Naive_Madura_CD24P_CD38P_LMI3 |
| 25 | CD45ROP_CD45RAP_Células_T_LMI2 | 62 | IgMN_LMI3 |
| 26 | CD45ROP_CD45RAN_Células_T_LMI2 | 63 | CD24P_CD38P_CD27P_IgMP_LMI3 |
| 27 | CD45RON_CD45RAN_Células_T_LMI2 | 64 | Efector_Natural_CD24P_CD38P_IgDP_IgMP_LMI3 |
| 28 | CD4P_CD25P_CD127low_Treg_LMI2 | 65 | Plasmablast_IgDN_IgMN_CD38PP_LMI3 |
| 29 | CD4P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2 | 66 | Class_switched_memory_IgDN_IgMN_CD38P_CD27P_LMI3 |
| 30 | CD4P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2 | 67 | IgDN_IgMN_CD27N_LMI3 |
| 31 | CD4P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2 | 68 | Células_B_Naive_IgDP_IgMP_CD27N_LMI3 |
| 32 | CD4P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2 | 69 | Células_B_Memoria_IgDP_IgMP_CD27P_LMI3 |
| 33 | CD4P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2 | 70 | IgDN_IgMP_CD27N_LMI3 |
| 34 | CD4P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2 | 71 | IgM_only_memory_IgDN_IgMP_CD27_LMI3 |
| 35 | CD4P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2 | 72 | IgMP_CD38PP_CD27P_LMI3 |
| 36 | CD4P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2 | 73 | Class_non_switched_memory_IgMP_CD38P_CD27P_LMI3 |
| 37 | CD8P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2 | 74 | IgMP_CD27N_LMI3 |

Tabla 15. Continuación.

| 91 subpoblaciones derivadas de la sangre periférica | | | |
|---|------------------------------------|----|-------------------------------|
| 75 | Lymphocitos_PBMC_LMI4 | 84 | Prol_CD4P_Tconv_PBMC_LMI4 |
| 76 | CD4P_Células T_PBMC_LMI4 | 85 | Prol_CD4P_Treg_PBMC_LMI4 |
| 77 | DP_CD4P_CD8P_PBMC_LMI4 | 86 | Prol_CD8_PBMC_LMI4 |
| 78 | DN_CD4N_CD8N_PBMC_LMI4 | 87 | Treg_FOXP3P_HeliosP_PBMC_LMI4 |
| 79 | CD8P_Células T_PBMC_LMI4 | 88 | Treg_FOXP3P_HeliosN_PBMC_LMI4 |
| 80 | CD25N_CD127P_Tconv_PBMC_LMI4 | 89 | Treg_CD45RAP_PBMC_LMI4 |
| 81 | CD4P_CD25P_CD127low_Treg_PBMC_LMI4 | 90 | Treg_CD45RAN_PBMC_LMI4 |
| 82 | Prol_DN_CD4NCD8N_PBMC_LMI4 | 91 | Treg_HLANDRP_PBMC_LMI4 |
| 83 | Prol_DP_CD4PCD8P_PBMC_LMI4 | | |

NOTA: Células incluidas en LMI1-3 fueron medidas en sangre complete y aquellas incluidas en LMI4 en PBMCs

Las poblaciones celulares se analizaron por citometría de 10 colores dentro de las 3 horas siguientes a la extracción de la muestra sanguínea con el citómetro Navios de Beckman Coulter y el programa Kaluza (Beckman Coulter, v.1.3) con el que se realizó el conteo celular. Para reducir el ruido entre experimentos e incrementar el poder estadístico, el conteo celular se realizó calculando los porcentajes con los tipos celulares parentales y supra-parentales, es decir, de los dos tipos celulares inmediatamente superiores jerárquicamente [464]. Los detalles sobre los valores crudos de citometría y los archivos del análisis de datos de citometría pueden consultarse en una base de datos (<http://hfgp.bbMRI.nl>) previa solicitud a los coordinadores del HFGP [460-462, 465].

13. Análisis de correlación de los marcadores genéticos y 103 proteínas inflamatorias en suero.

Finalmente, realizamos una correlación de los marcadores genéticos de interés con datos de 103 proteínas inflamatorias séricas medidas en la cohorte 500FG con el kit comercial Olink® Inflammation panel (Olink, Sweden). Los valores de los niveles proteicos fueron definidos en escala logarítmica en base 2 (\log_2) que fueron normalizados utilizando muestras puente entre diferentes lotes. La información y protocolos detallados de este panel pueden ser consultados en <https://www.olink.com/products/target/inflammation/>.

El panel de inflamación de Olink ha sido cuidadosamente diseñado y validado por la empresa y está basado en la tecnología de ensayos de ligamiento por proximidad (PEA, Proximity Extension Assays [466, 467]) en la que pares de anticuerpos unidos a oligonucleótidos se unen a sus respectivas proteínas diana si están presentes en la muestra. Esta técnica permite detectar múltiples proteínas simultáneamente (multiplex) y además recupera una mayor cantidad de señal que las técnicas convencionales, convirtiéndola en una técnica de alta sensibilidad.

El valor de significación estadística para estos análisis se realizó considerando el número de proteínas analizadas (n=103; Tabla 16 y Figura 30), pero, además, el número de marcadores genéticos y modelos de herencia estudiados.

Tabla 16. 103 proteínas inflamatorias en suero.

| 103 proteínas inflamatorias en suero | | | | | | |
|--------------------------------------|------------|----|------------|----|----------------|-------------------------|
| | Marcadores | | Marcadores | | Marcadores | Marcadores_Plasma |
| 1 | 4E-BP1 | 32 | FGF-19 | 63 | LAP TGF-beta-1 | 1 hsCRP |
| 2 | ADA | 33 | FGF-21 | 64 | LIF | 2 IL18bpx |
| 3 | ARTN | 34 | FGF-23 | 65 | LIF-R | 3 Resistin |
| 4 | AXIN1 | 35 | FGF-5 | 66 | MCP-1 | 4 Leptin |
| 5 | Beta-NGF | 36 | FIt3L | 67 | MCP-2 | 5 Adiponectin |
| 6 | CASP-8 | 37 | GDNF | 68 | MCP-3 | 6 AAT |
| 7 | CCL11 | 38 | HGF | 69 | MCP-4 | 7 IL-1Ra_Q (Quantikine) |
| 8 | CCL19 | 39 | IFN-gamma | 70 | MMP-1 | 8 IL18 pg/mL |
| 9 | CCL20 | 40 | IL-1 alpha | 71 | MMP-10 | 9 IL-1b pg/mL |
| 10 | CCL23 | 41 | IL10 | 72 | NRTN | 10 IL-6 pg/mL |
| 11 | CCL25 | 42 | IL-10RA | 73 | NT-3 | 11 VEGF-A |
| 12 | CCL28 | 43 | IL-10RB | 74 | OPG | |
| 13 | CCL3 | 44 | IL-12B | 75 | OSM | |
| 14 | CCL4 | 45 | IL13 | 76 | PD-L1 | |
| 15 | CD244 | 46 | IL-15RA | 77 | SCF | |
| 16 | CD40 | 47 | IL-17A | 78 | SIRT2 | |
| 17 | CD5 | 48 | IL-17C | 79 | SLAMF1 | |
| 18 | CD6 | 49 | IL18 | 80 | ST1A1 | |
| 19 | CD8A | 50 | IL-18R1 | 81 | STAMBP | |
| 20 | CDCP1 | 51 | IL2 | 82 | TGF-alpha | |
| 21 | CSF-1 | 52 | IL-20 | 83 | TNF | |
| 22 | CST5 | 53 | IL-20RA | 84 | TNFB | |
| 23 | CX3CL1 | 54 | IL-22 RA1 | 85 | TNFRSF9 | |
| 24 | CXCL1 | 55 | IL-24 | 86 | TNFSF14 | |
| 25 | CXCL10 | 56 | IL-2RB | 87 | TRAIL | |
| 26 | CXCL11 | 57 | IL33 | 88 | TRANCE | |
| 27 | CXCL5 | 58 | IL4 | 89 | TSLP | |
| 28 | CXCL6 | 59 | IL5 | 90 | TWEAK | |
| 29 | CXCL9 | 60 | IL6 | 91 | uPA | |
| 30 | DNER | 61 | IL7 | 92 | VEGFA | |
| 31 | EN-RAGE | 62 | IL8 | | | |

Resultados y Discusión



Analizar el papel de los polimorfismos relacionados con el transporte, metabolismo y señalización de las hormonas esteroideas en la determinación del riesgo a desarrollar AR y la respuesta a fármacos anti-TNF.

ARTÍCULO Nº 1. Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients.


Luz M. Canet, Jose M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Ana Rodríguez Ramos, Carmen B. Lupiañez, Helena Canhão, Manuel Martínez-Bueno, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Signe B Sorensen, Merete L Hetland, María José Soto-Pino, Miguel A. Ferrer, Antonio García, Bente Glintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Alfonso González-Utrilla, Miguel Ángel López Nevot, Pablo Conesa-Zamor, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Sven Erik Hobe Jacobsen, Eduardo Collantes-Estevez, Luca Quartuccio, Federico Canzian. João E. Fonseca, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, Juan Sainz. **The Pharmacogenomics Journal. Oct 2018.** <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0057-x>.

The Pharmacogenomics Journal
<https://doi.org/10.1038/s41397-018-0057-x>

ARTICLE



Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients

Luz M. Canet¹ · Jose M. Sánchez-Maldonado¹ · Rafael Cáliz^{1,2} · Ana Rodríguez Ramos¹ · Carmen B. Lupiañez¹ · Helena Canhão³ · Manuel Martínez-Bueno⁴ · Alejandro Escudero⁵ · Juana Segura-Catena¹ · Signe B Sorensen^{6,7} · Merete L Hetland^{6,7} · María José Soto-Pino² · Miguel A. Ferrer² · Antonio García² · Bente Glintborg^{6,8} · Ileana Filipescu⁹ · Eva Pérez-Pampin¹⁰ · Alfonso González-Utrilla² · Miguel Ángel López Nevot¹¹ · Pablo Conesa-Zamora¹² · Alfons den Broeder¹³ · Salvatore De Vita¹⁴ · Sven Erik Hobe Jacobsen^{6,7} · Eduardo Collantes-Estevez⁵ · Luca Quartuccio¹⁴ · Federico Canzian¹⁵ · João E. Fonseca^{16,17} · Marieke J. H. Coenen¹³ · Vibeke Andersen^{18,19} · Juan Sainz ^{1,2}

Received: 29 November 2017 / Revised: 19 June 2018 / Accepted: 10 August 2018
© Springer Nature Limited 2018

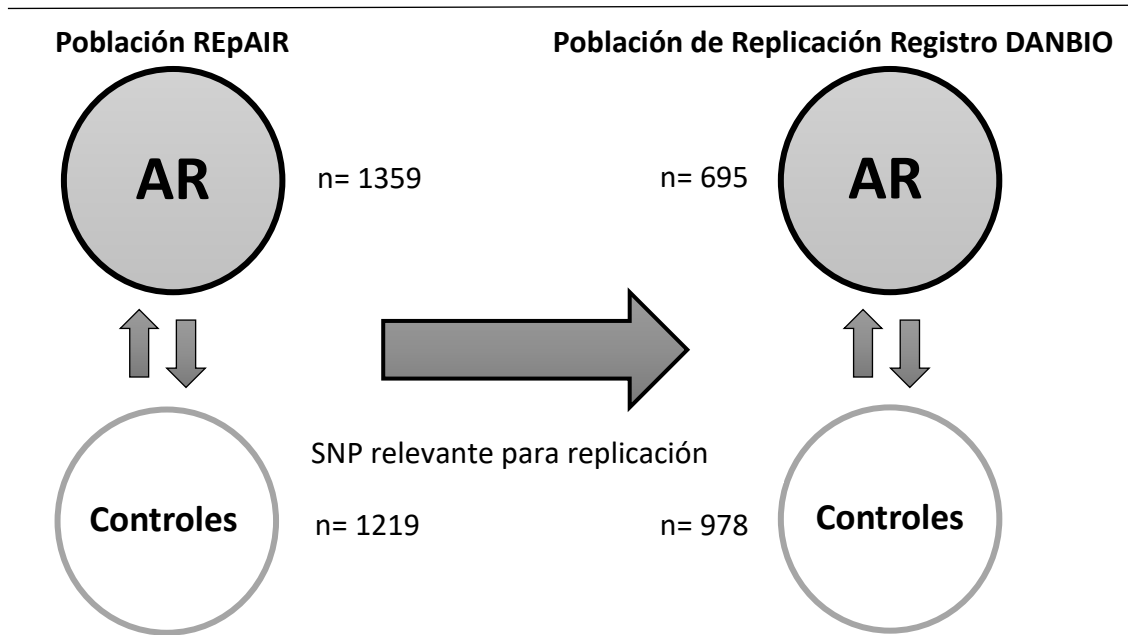
Abstract

The aim of this case-control study was to evaluate whether 47 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in steroid hormone-related genes are associated with the risk of RA and anti-TNF drug response. We conducted a case-control study in 3 European populations including 2936 RA patients and 2197 healthy controls. Of those, a total of 1985 RA patients were treated with anti-TNF blockers. The association of potentially interesting markers in the discovery population was validated through meta-analysis with data from DREAM and DANBIO registries. Although none of the selected variants had a relevant role in modulating RA risk, the meta-analysis of the linear regression data with those from the DREAM and DANBIO registries showed a significant correlation of the *CYP3A4*_{rs11773597} and *CYP2C9*_{rs1799853} variants with changes in DAS28 after the administration of anti-TNF drugs ($P = 0.00074$ and $P = 0.006$, respectively). An overall haplotype analysis also showed that the *ESR2*₀₀₀ haplotype significantly associated with a reduced chance of having poor response to anti-TNF drugs ($P = 0.0009$). Finally, a ROC curve analysis confirmed that a model built with eight steroid hormone-related variants significantly improved the ability to predict drug response compared with the reference model including demographic and clinical variables (AUC = 0.633 vs. AUC = 0.556; $P_{LR, best} = 1.52 \times 10^{-6}$). These data together with those reporting that the *CYP3A4* and *ESR2* SNPs correlate with the expression of *TRIM4* and *ESR2* mRNAs in PBMCs (ranging from $P = 1.98 \times 10^{-6}$ to $P = 2.0 \times 10^{-35}$), and that the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP modulates the efficiency of multiple drugs, suggest that steroid hormone-related genes may have a role in determining the response to anti-TNF drugs.

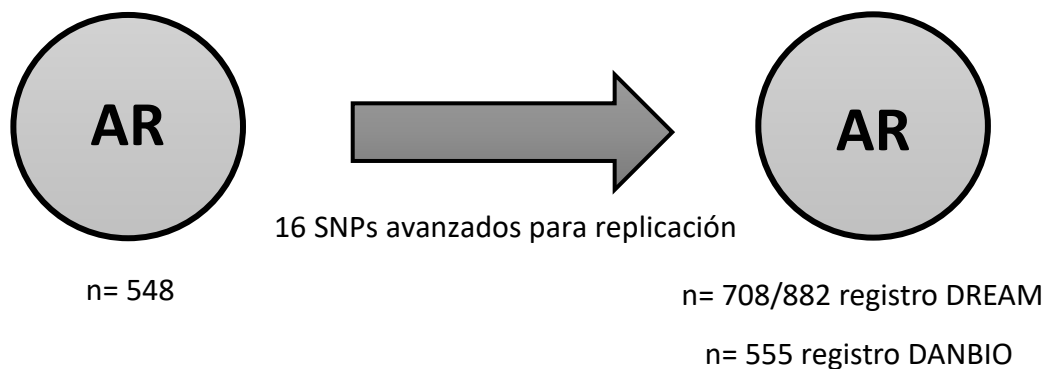
1. Características de la población de estudio.

La población de estudio estuvo formada por un total de 2936 casos de AR y 2197 individuos sanos. La edad media de la población de casos fue de 57.10 ± 13.36 mientras que la de controles fue 50.01 ± 12.16 . La ratio entre mujeres y hombres fue de 3 a 1 y un total de 1985 de los pacientes fueron tratados en primera línea con fármacos anti-TNF. En la Tabla 17 y en el diagrama mostrado a continuación vemos las características demográficas y clínicas en los pacientes de AR incluidos en este primer estudio.

Análisis de riesgo a AR (n=2578)



Análisis de respuesta a fármaco anti-TNF (n=1985)



NOTA: Para el análisis de los 882 pacientes con AR del registro DREAM se utilizaron datos GWAS [456]. En el caso de ser marcadores imputados, estos fueron genotipados en un total de 708 pacientes del registro con ADN disponible.

Tabla 17. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con AR.

| Características Demográficas | Población REPAIR (n=1359) | Registro DREAM (n=882) | Registro DANBIO (n=695) |
|----------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Edad (años) | 60.50 ± 13.04 | 54.63 ± 12.80 | 54.27 ± 13.30 |
| Ratio de género (mujer/hombre) | 4.27 (1101/258) | 2.07 (478/230) | 2.80 (512/183) |
| Evaluación Clínica | | | |
| FR-positivo* | 708 (69.8) | 534 (77.62) | 221 (64.06) |
| Anti-CCP-positivo* | 566 (70.9) | 151 (61.89) | 390 (72.90) |
| DAS28 en estado basal | 5.80 ± 2.19 | 5.33 ± 1.26 | 4.77 ± 1.23 |
| Duración de la enfermedad (años) | 18.69 ± 9.15 | 9.70 ± 9.57 | 7.89 ± 8.86 |
| Tratamientos | | | |
| DMARDs en primera línea | | | |
| Metotrexato (%) | 812 (59.70) | 463 (65.40) | 514 (73.95) |
| Leflunomida (%) | 324 (23.82) | ND | ND |
| Sulfasalacina (%) | 181 (13.31) | ND | ND |
| Primera Agente Biológico | | | |
| Infliximab (%) | 372 (27.35) | 244 (34.46) | 159 (22.88) |
| Etanercept (%) | 224 (16.47) | 130 (18.36) | 200 (28.78) |
| Adalimumab (%) | 190 (13.97) | 334 (47.18) | 173 (24.89) |
| Golimumab (%) | 16 (1.18) | - | 47 (6.76) |
| Certolizumab (%) | - | - | 72 (10.36) |
| Rituximab (%) | - | - | 16 (2.30) |
| Tocilizumab (%) | 6 (0.44) | - | 19 (2.73) |
| Anakinra (%) | - | - | 2 (0.29) |
| Otros (%) | - | - | 7 (1.01) |

Los datos son la media ± SD o n (%). *Datos Clínicos para 708 pacientes con AR con ADN disponible; *Los valores de FR estuvieron limitados a un total de 1014, 688 y 345 pacientes de AR en las poblaciones de REPAIR, DREAM y DANBIO, respectivamente. Abreviaturas: anti-CCP (Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados), DAS28 (Índice de la actividad de la enfermedad), DMARDs (medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), ND (no determinados) y FR (factor reumatoide).

2. Análisis de asociación.

En este primer estudio de genes candidato se analizaron 47 variantes genéticas implicadas en el transporte, señalización y metabolismo de las hormonas esteroideas y se evaluó su asociación con el riesgo a desarrollar AR (Tabla 18) y la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF. El análisis de asociación con el riesgo a desarrollar AR no ofreció resultados relevantes. Sin embargo, el análisis de respuesta terapéutica mostró que los alelos *CYP3A4*_{rs11773597C}, *CYP1A1*_{rs1799814A}, *CYP1B1*_{rs1056836C}, *GSTP1*_{rs1695G}, y *GSTP1*_{rs1138272T} mostraban una correlación positiva con los cambios de DAS28 (OR_{alélica}=1.43, 1.66, 1.34, 1.22, y 1.55, respectivamente), mientras que los alelos *PGR*_{rs518162A} y *SULT1A1*_{rs9282861A} mostraron un efecto estadísticamente significativo, pero en sentido opuesto (OR_{alélica}=0.74 y 0.80) (Tabla 19).

Tabla 18. Selección de SNPs de receptores de hormonas y transporte, en enzimas metabolizadoras de fase I y II.

| Genes | Cr. | dbSNP rs# | Sustitución Nucleótidos | Efecto alélico | Localización |
|---------|-----|------------|-------------------------|----------------|---------------|
| ABCB1 | 7 | rs1045642 | T/C | T | I1145I |
| ABCB1 | 7 | rs1922242 | A/T | A | Intrónico |
| ABCB1 | 7 | rs2229109 | T/C | T | S400N |
| ABCB1 | 7 | rs1202168 | C/T | T | Intrónico |
| ABCB1 | 7 | rs9282564 | T/C | T | N21D |
| ABCB1 | 7 | rs2214102 | T/C | T | 5'-UTR |
| CYP1A1 | 15 | rs1799814 | A/C | A | T461N |
| CYP1A2 | 15 | rs762551 | A/C | A | Intrónico |
| CYP1B1 | 2 | rs1800440 | T/C | T | N453T |
| CYP1B1 | 2 | rs1056836 | C/G | C | L432V |
| CYP1B1 | 2 | rs10012 | C/G | G | R48G |
| CYP2C9 | 10 | rs1799853 | C/T | T | R144C |
| CYP2C9 | 10 | rs1057910 | A/C | A | I359L |
| CYP2C19 | 10 | rs12248560 | C/T | T | cerca del gen |
| CYP2C19 | 10 | rs4244285 | A/G | A | P227P |
| CYP3A4 | 7 | rs2740574 | T/C | T | cerca del gen |
| CYP3A4 | 7 | rs11773597 | C/G | C | cerca del gen |
| CYP17A1 | 10 | rs743572 | A/G | G | 5'-UTR |
| ESR1 | 6 | rs851984 | G/A | A | Intrónico |
| ESR1 | 6 | rs2881766 | G/T | T | Intrónico |
| ESR1 | 6 | rs2071454 | G/T | G | 5'-UTR |
| ESR1 | 6 | rs2077647 | A/G | G | S10S |
| ESR1 | 6 | rs827421 | G/A | A | Intrónico |
| ESR1 | 6 | rs2234693 | C/T | C | Intrónico |
| ESR1 | 6 | rs9340799 | A/G | A | Intrónico |
| ESR1 | 6 | rs1801132 | C/G | G | P325P |
| ESR1 | 6 | rs3798577 | C/T | T | 3'-UTR |
| ESR1 | 6 | rs910416 | C/T | T | cerca del gen |
| ESR2 | 14 | rs1255998 | C/G | C | 3'-UTR |
| ESR2 | 14 | rs928554 | T/C | T | 3'-UTR |
| ESR2 | 14 | rs4986938 | T/C | T | 3'-UTR |
| ESR2 | 14 | rs1271572 | C/A | A | cerca del gen |
| GSTP1 | 11 | rs1695 | A/G | G | I105V |
| GSTP1 | 11 | rs1138272 | C/T | T | A114V |
| HSD17B1 | 17 | rs605059 | C/T | T | G313S |
| NR1I2 | 3 | rs2276706 | A/G | A | cerca del gen |
| NR1I2 | 3 | rs1464603 | C/T | C | Intrónico |
| NR1I2 | 3 | rs6785049 | A/G | G | Intrónico |
| NR1I2 | 3 | rs2276707 | C/T | T | Intrónico |
| NR1I2 | 3 | rs1054191 | A/G | A | 3'-UTR |
| NR1I2 | 3 | rs3814057 | A/C | C | 3'-UTR |
| PGR | 11 | rs1042838 | C/A | A | V660L |
| PGR | 11 | rs1379130 | A/G | A | G393G |
| PGR | 11 | rs10895068 | A/G | A | 5'-UTR |
| PGR | 11 | rs518162 | A/G | A | 5'-UTR |
| SHBG | 17 | rs6259 | A/G | A | D356N |
| SULT1A1 | 16 | rs9282861 | A/G | A | R213H |

MAF, mínima frecuencia alélica, SNP: polimorfismo de único nucleótido, UTR: región no traducible.

El meta-análisis de los datos de REpAIR con los de los registros DREAM y DANBIO confirmó que cada copia del alelo C de la variante *CYP3A4*_{rs11773597} incrementa de forma significativa la probabilidad de tener un descenso importante en el DAS28 después de recibir el tratamiento con fármacos anti-TNF ($OR_{alélica}=1.36$, $P=0.00074$, $P_{Het}=0.28$; Tabla 19 y Figura 31). Es importante destacar que la asociación de este marcador sobrevivía la corrección de múltiples comparaciones, lo que sugería un claro impacto de esta variante en la modulación de la respuesta terapéutica a fármacos anti-TNF.

Aunque la asociación no permanecía significativa tras el ajuste por comparaciones múltiples, el meta-análisis de las 3 poblaciones confirmó también que el alelo *CYP2A1*_{rs1799853T} correlacionaba inversamente con cambios en el DAS28 ($OR=0.81$, $P=0.006$, $P_{Het}=0.686$; Tabla 19; Figura 31). En línea con estos resultados, un análisis de las bases de datos de expresión génica reveló que el alelo *CYP3A4*_{rs11773597C} correlacionaba con la expresión de los niveles del ARNm del gen *TRIM4* en PBMCs ($P=2.01 \cdot 10^{-35}$, $Z \text{ score}=12.42$), un gen que tiene un papel destacado en la regulación de los niveles de las hormonas esteroideas y en el control de importantes vías de señalización en la respuesta inmunitaria como son las vías del NFκB y del INFγ. Además de estos hallazgos, encontramos que este polimorfismo mapea entre zonas de unión a histonas en cinco tejidos, incluyendo el músculo esquelético y sistemas conjuntivos, lo que sugiere que este SNP también podría estar involucrado en la modulación de los cambios epigenéticos y en la transcripción génica en estos tejidos. Por otro lado, tiene sentido plantear la posibilidad de que la variante no sinónima *CYP2A1*_{rs1799853} pueda ejercer su función modulando la respuesta a fármacos anti-TNF, ya que esta variante se ha catalogado como pobre metabolizador para un amplio espectro de medicamentos y modula la expresión génica del ARNm de genes como *MAFK* ($P=1.0 \cdot 10^{-31}$), que está implicado en farmacodinámica.

Tabla 19. Meta-análisis para la asociación ente los SNPs de las hormonas esteroideas y cambio relativo en

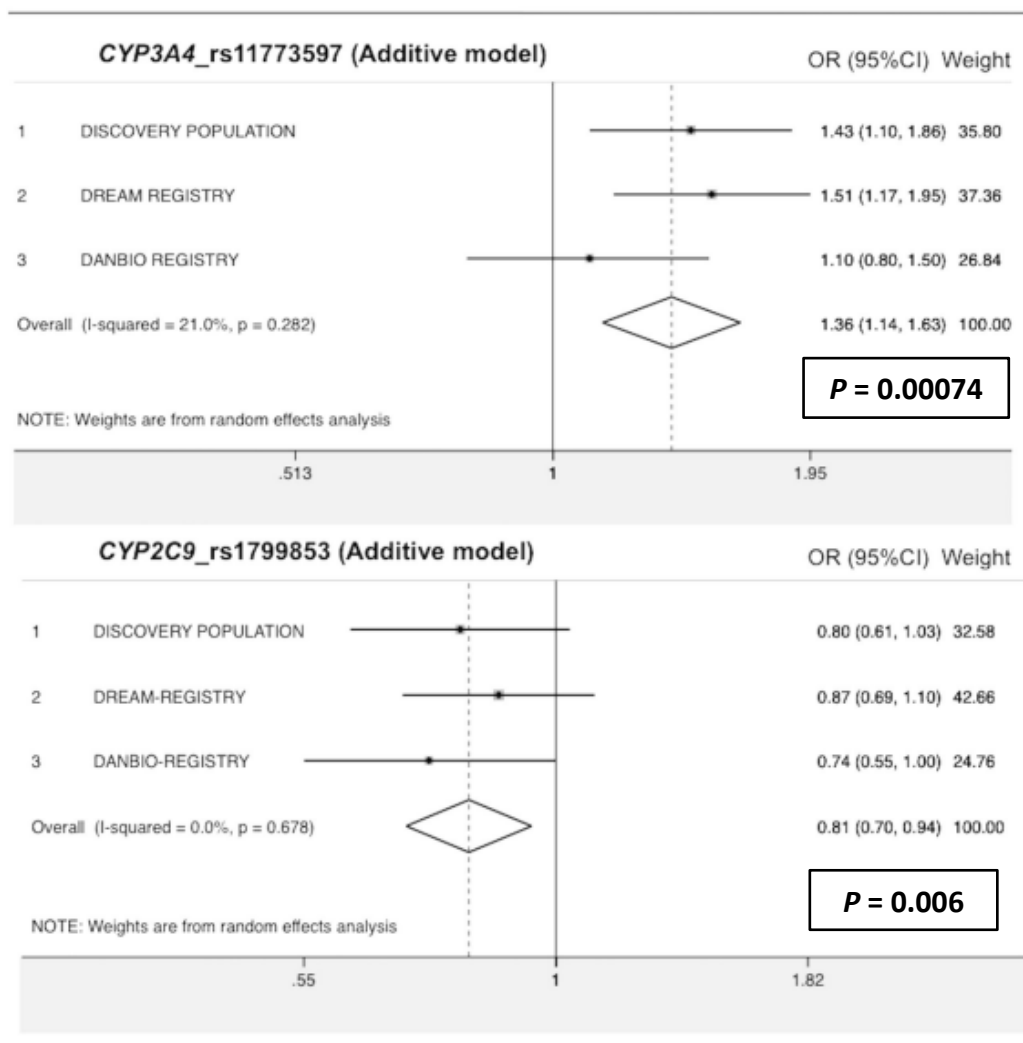
| Genes | ID SNPs | Cr. | Población REpAIR (n=548) | | Replicación Registro DREAM (n=882) | | Replicación Registro |
|----------------|--------------|-----|--|--------------|--|--------------|--|
| | | | OR (95% CI) ^o | P | OR (95% CI) ^o | P | OR (95% CI) ^o |
| ABCB1 | rs1045642_T | 7 | 1.01 (0.86–1.20) | 0.88 | ND | ND | ND |
| ABCB1 | rs1922242_A | 7 | 1.11 (0.94–1.32) | 0.21 | 0.98 (0.88–1.08)* | 0.67 | ND |
| ABCB1 | rs2229109_T | 7 | 0.74 (0.51–1.07) | 0.11 | 1.09 (0.77–1.54)* | 0.63 | ND |
| ABCB1 | rs1202168_T | 7 | 1.07 (0.90–1.27) | 0.43 | ND | ND | ND |
| ABCB1 | rs9282564_T | 7 | 1.16 (0.81–1.66) | 0.41 | 0.89 (0.72–1.10) | 0.29 | ND |
| ABCB1 | rs2214102_T | 7 | NA (NA-NA) | NA | 0.96 (0.80–1.15) | 0.63 | ND |
| CYP1A1 | rs1799814_A | 15 | 1.66 (1.19–2.34) | 0.003 | 1.03 (0.72–1.46) ψ | 0.88 | 0.87 (0.56–1.36) ψ |
| CYP1A2 | rs762551_A | 15 | 0.95 (0.79–1.14) | 0.57 | 0.95 (0.85–1.05)* | 0.32 | ND |
| CYP1B1 | rs1800440_T | 2 | 0.96 (0.78–1.18) | 0.68 | 0.98 (0.85–1.13) | 0.78 | ND |
| CYP1B1 | rs1056836_C | 2 | 1.34 (1.03–1.77)\S | 0.032 | 1.04 (0.84–1.29) $\S\psi$ | 0.72 | 0.83 (0.64–1.08) $\S\psi$ |
| CYP1B1 | rs10012_G | 2 | 0.87 (0.72–1.04) | 0.12 | 1.01 (0.90–1.14)* | 0.83 | ND |
| CYP2C9 | rs1799853_T | 10 | 0.80 (0.61–1.03) ⁺ | 0.088 | 0.87 (0.70–1.09) ⁺ ψ | 0.24 | 0.74 (0.55–1.00)⁺ψ |
| CYP2C9 | rs1057910_A | 10 | 0.92 (0.63–1.34) | 0.67 | 1.08 (0.90–1.31) | 0.42 | ND |
| CYP2C19 | rs12248560_T | 10 | 1.21 (0.99–1.50) | 0.068 | 1.01 (0.89–1.13)* | 0.93 | ND |
| CYP2C19 | rs4244285_A | 10 | 1.06 (0.84–1.34) | 0.63 | 1.01 (0.88–1.16)* | 0.88 | ND |
| CYP3A4 | rs2740574_T | 7 | 0.85 (0.59–1.22) | 0.37 | 0.89 (0.69–1.15)* | 0.37 | ND |
| CYP3A4 | rs11773597_C | 7 | 1.43 (1.10–1.86) | 0.008 | 1.51 (1.17–1.95)ψ | 0.001 | 1.10 (0.80–1.50) ψ |
| CYP17A1 | rs743572_G | 10 | 0.92 (0.77–1.08) | 0.30 | ND | ND | ND |
| ESR1 | rs851984_A | 6 | 1.03 (0.86–1.23) | 0.73 | 1.09 (0.97–1.22)* | 0.16 | ND |
| ESR1 | rs2881766_T | 6 | 0.98 (0.79–1.21) | 0.82 | 1.03 (0.90–1.16) | 0.70 | ND |
| ESR1 | rs2071454_G | 6 | 1.19 (0.91–1.56) | 0.20 | ND | ND | ND |
| ESR1 | rs2077647_G | 6 | 1.02 (0.86–1.21) | 0.86 | ND | ND | ND |
| ESR1 | rs827421_A | 6 | 0.95 (0.80–1.13) | 0.55 | 0.93 (0.85–1.03)* | 0.16 | ND |
| ESR1 | rs2234693_C | 6 | 0.98 (0.83–1.16) | 0.81 | ND | ND | ND |
| ESR1 | rs9340799_A | 6 | 1.06 (0.88–1.27) | 0.53 | 1.18 (1.02–1.36)ψ | 0.019 | 0.95 (0.78–1.14) ψ |
| ESR1 | rs1801132_G | 6 | 1.11 (0.91–1.36) | 0.31 | 0.98 (0.85–1.12) ψ | 0.75 | 1.11 (0.88–1.39) ψ |
| ESR1 | rs3798577_T | 6 | 1.03 (0.88–1.22) | 0.69 | 0.87 (0.76–0.99)ψ | 0.031 | 0.99 (0.83–1.18) ψ |
| ESR1 | rs910416_T | 6 | 0.99 (0.82–1.18) | 0.87 | 0.97 (0.88–1.07)* | 0.49 | ND |

Tabla 19. Continuación.

| | | | | | | | |
|----------------|--------------|----|-------------------------------------|--------------|--------------------------------------|-------|-------------------------------------|
| ESR2 | rs1255998_G | 14 | 0.90 (0.70–1.44) | 0.38 | 1.10 (0.89–1.35) ψ | 0.37 | 1.08 (0.81–1.45) ψ |
| ESR2 | rs928554_T | 14 | 1.00 (0.84–1.20) | 0.98 | 0.94 (0.85–1.03)* | 0.19 | ND |
| ESR2 | rs4986938_T | 14 | 0.97 (0.82–1.15) | 0.74 | 0.95 (0.86–1.06) ψ | 0.36 | 1.03 (0.87–1.23) ψ |
| ESR2 | rs1271572_A | 14 | 0.95 (0.79–1.14) | 0.56 | 0.92 (0.80–1.05) ψ | 0.23 | 0.96 (0.81–1.14) ψ |
| GSTP1 | rs1695_G | 11 | 1.22 (1.02–1.45) | 0.033 | 1.15 (0.99–1.33) ψ | 0.062 | 0.94 (0.79–1.11) ψ |
| GSTP1 | rs1138272_T | 11 | 1.55 (1.06–2.27)[†] | 0.023 | 1.15 (0.89–1.49) [†] ψ | 0.29 | 1.07(0.76–1.51) [†] ψ |
| HSD17B1 | rs605059_T | 17 | 0.98 (0.83–1.17) | 0.86 | ND | ND | ND |
| NR1I2 | rs2276706_A | 3 | 1.07 (0.90–1.27) | 0.45 | 0.98 (0.89–1.09)* | 0.73 | ND |
| NR1I2 | rs1464603_C | 3 | 1.16 (0.96–1.39) | 0.12 | 1.05 (0.91–1.21) ψ | 0.48 | 0.84 (0.69–1.01) ψ |
| NR1I2 | rs6785049_G | 3 | 1.03 (0.87–1.23) | 0.71 | ND | ND | ND |
| NR1I2 | rs2276707_T | 3 | 0.94 (0.75–1.19) | 0.61 | 1.13 (0.94–1.36) ψ | 0.20 | ND |
| NR1I2 | rs1054191_A | 3 | 1.00 (0.80–1.26) | 0.99 | 1.06 (0.92–1.23)* | 0.37 | ND |
| NR1I2 | rs3814057_C | 3 | 0.99 (0.78–1.24) | 0.89 | 1.10 (0.92–1.32) ψ | 0.30 | 0.87 (0.70–1.09) ψ |
| PGR | rs1042838_A | 11 | 0.97 (0.75–1.25) | 0.82 | 1.13 (0.99–1.29) | 0.076 | ND |
| PGR | rs1379130_A | 11 | 1.13 (0.94–1.36) | 0.19 | ND | ND | ND |
| PGR | rs10895068_A | 11 | 0.75 (0.50–1.13) | 0.17 | ND | ND | ND |
| PGR | rs518162_A | 11 | 0.74 (0.56–0.99) | 0.042 | 0.84 (0.68–1.03) | 0.094 | 1.07(0.73–1.58) |
| SHBG | rs6259_A | 17 | 0.87 (0.66–1.16) | 0.35 | 1.00 (0.86–1.18) | 0.96 | ND |
| SULT1A1 | rs9282861_A | 16 | 0.80 (0.67–0.96) | 0.017 | 1.05 (0.91–1.21) ψ | 0.50 | 1.04 (0.85–1.27) ψ |

Intervalo de confianza (CI), odds ratio (OR), SNP polimorfismo de un solo nucleótido. Modelos ajustados por efecto aleatorio mediante el modelo de herencia aditivo ajustado por sexo, edad y país de origen (la población de replicación fue ajustada por edad y sexo), modelo de herencia dominante ajustado por sexo, edad y país de origen (la población de replicación fue ajustada por edad y sexo), modelo de herencia recesivo ajustado por sexo, edad y país de origen (la población de replicación fue ajustada por edad y sexo). ψ SNPs fué la población de replicación DREAM (n = 708) y DANBIO (n = 555). *Genotipo imputado. $P < 0.05$ en negrita.

Figura 31. Meta-análisis de los SNPs *CYP3A4* y *CYP2C9* asociados con la respuesta a fármacos anti-TNF.



3. Análisis de Haplotipos.

Basándonos en los hallazgos descritos, decidimos además evaluar si existían haplotipos específicos en los genes relacionados con la señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas y si éstos podrían estar ejerciendo algún efecto sobre la respuesta a fármacos anti-TNF. El análisis de asociación de haplotipos se ajustó considerando la edad, el género y país de origen como factores confundentes para cada locus y considerando marcadores independientes, es decir, con un valor de desequilibrio de unión de $r^2 < 0.80$. Los resultados más relevantes los encontramos para el haplotipo *ESR2*_{GGG} que asociaba con una menor probabilidad de fracaso terapéutico tras la administración de fármacos anti-TNF (OR=0.64, $P=0.0009$; Tabla 20). Es importante mencionar que los SNPs *ESR2*_{rs928554}, *ESR2*_{rs4986938} y *ESR2*_{rs1255998} que forman parte de este haplotipo correlacionan de una manera muy fuerte con los niveles de expresión del ARNm de *ESR2* en sangre completa y/o una línea celular linfoblatoide ($P=2.55 \cdot 10^{-2}$ a $P=2.82 \cdot 10^{-26}$), pero también en otros tejidos ($P=3.858 \cdot 10^{-8}$). Por otra

parte, el análisis de haplotipos también reveló una leve asociación con el haplotipo *GSTP1*_{GT} con un menor riesgo de tener una mala respuesta con fármacos anti-TNF (OR=0.70, *P*=0.012). En apoyo a este hallazgo observamos que la presencia del SNP *GSTP1*_{rs1695} correlacionaba con los niveles de expresión del ARNm del gen *GSTP1* en células mononucleares de sangre periférica (*P*=5.58•10⁻¹⁶) y en una amplia variedad de tejidos (*P*=9.73•10⁻⁶ a *P*=8.06•10⁻⁹). Asimismo, encontramos que este marcador genético mapea en zonas de unión a promotores y potenciadores de histonas en múltiples tipos celulares y tejidos y cambia sitios de unión para factores de transcripción como POL2, CTCF, MAX y USF1.

Dado que los polimorfismos en los genes *ESR2* y *GSTP1* solo parecían tener un papel relevante sobre la respuesta terapéutica en los análisis de haplotipos podemos sugerir que el efecto de estos genes sobre la respuesta farmacológica requiere de la presencia de un conjunto de alelos específicos y no a la presencia de una variante específica. Además, estos resultados sugieren que los polimorfismos en *ESR2* y *GSTP1* podrían constituir un eQTL para la respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes con AR. No obstante, el efecto de ambos genes sobre la respuesta terapéutica debe ser aún confirmado en estudios futuros.

Tabla 20. Análisis de haplotipos en relación a la respuesta a fármacos anti-TNF.

| <i>ESR2</i> [*] | | | RepAIR R vs. NR + MR (N=1811) | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------|
| <i>ESR2</i> _{rs1255998} | <i>ESR2</i> _{rs1271572} | <i>ESR2</i> _{rs4986938} | Freq | OR (95% CI) [†] | <i>P</i> |
| C | T | G | 0.3273 | 1.00 | --- |
| C | G | A | 0.3079 | 0.98 (0.81–1.20) | 0.88 |
| C | G | G | 0.1301 | 1.01 (0.78–1.30) | 0.97 |
| C | T | A | 0.1155 | 0.93 (0.71–1.21) | 0.57 |
| G | G | G | 0.0916 | 0.64 (0.49–0.83) | 0.00090 |
| G | G | A | 0.0162 | 0.78 (0.36–1.71) | 0.53 |
| G | T | A | 0.0106 | 1.56 (0.56–4.35) | 0.39 |
| <i>GSTP1</i> | | | R vs. NR + MR (N=1811) | | |
| <i>GSTP1</i> _{rs1695} | <i>GSTP1</i> _{rs1138272} | | Freq | OR (95% CI) [†] | (95%) |
| A | C | | 0.6409 | 1.00 | --- |
| G | C | | 0.2819 | 0.89 (0.76–1.05) | 0.16 |
| G | T | | 0.0714 | 0.70 (0.54–0.93) | 0.012 |

CI; Intervalo de confianza, MR; respuesta moderada, NR; no respondedores, R; respondedores. SNP; polimorfismo de un solo nucleótido. [†]Estimaciones calculado según el modelo de herencia dominante, ajustado por edad, sexo y país de origen. La frecuencia mínima considerada en el análisis de haplotipos fue 0.01. Los valores de *P* < 0.05 se marcan en negrita.

4. Análisis de modelos predictivos. Curva ROC.

Para finalizar este primer estudio, evaluamos si los SNPs seleccionados en las vías de señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas podían ser útiles para predecir la respuesta a fármacos anti-TNF. Para ello, construimos un modelo de regresión incluyendo variables demográficas, clínicas y genéticas (modelo

genético) y lo comparamos con un modelo de referencia que incluía solo variables demográficas y clínicas. El modelo que se obtuvo incluía 8 variantes genéticas que, junto con datos demográficos (edad y sexo) y el FR, mejoraba significativamente la capacidad de predecir la respuesta terapéutica frente a fármacos anti-TNF (AUC=0.633, 95%IC 0.60-0.67 vs. AUC=0.556, 95%IC 0.52–0.59; $PLR\ test=1.52 \cdot 10^{-7}$; Tabla 21 y Figura 32).

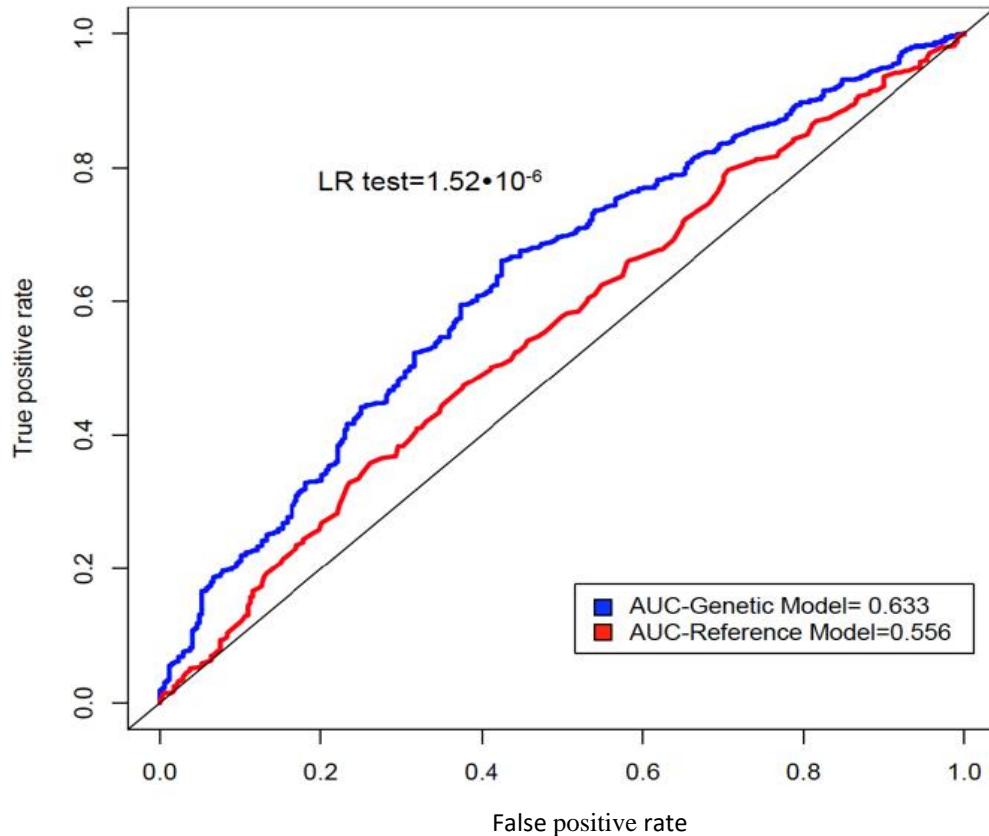
La consistencia del análisis predictivo fue confirmada mediante un análisis de 50.000 permutaciones que demostró que ninguno de los modelos obtenidos de forma aleatoria era más eficaz para predecir la respuesta a fármacos anti-TNF que nuestro modelo genético (AUC=0.5752, Z score=6.35 y $P_{Z_score(50,000perm)}=1.06 \cdot 10^{-10}$; Tabla 21 y Figura 32).

Tabla 21. Valor discriminativo AUC para los modelos incluyendo los SNPs relacionados con las hormonas esteroideas.

| Modelo de Referencia* | | | Prueba LR p -valor | |
|---------------------------------------|---------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | P-valor | OR (95% CI) | AUC 95% ^a CI | |
| Género | 0.932 | 0.987 (0.739–1.320) | | |
| Edad | 0.0056 | 0.987 (0.739–1.320) | | |
| FR | 0.382 | 1.142 (0.848–1.537) | 0.556 (0.52–0.59) ^o | |
| Modelo Predictivo incluyendo 8 SNPs** | | | | |
| | P-valor | OR (95% CI) | AUC 95% ^a CI | |
| CYP3A4_{rs11773597} | 0.068 | 0.711 (0.492–1.026) | | |
| CYP2C9_{rs1799853} | 0.07 | 1.333 (0.977–1.819) | | |
| ESR1_{rs3798577} | 0.016 | 1.432 (1.068–1.919) | | |
| ESR2_{rs1255998} | 0.012 | 0.656 (0.473–0.910) | | |
| ESR2_{rs1271572} | 0.042 | 1.364 (1.011–1.840) | | |
| GSTP1_{rs1695} | 0.048 | 0.759 (0.577–0.998) | | |
| NR1I2_{rs1464603} | 0.0028 | 1.502 (1.150–1.962) | | |
| CYP1A1_{rs1799814} | 0.014 | 0.577 (0.372–0.895) | | |
| Género | 0.858 | 1.028 (0.763–1.384) | | |
| Edad | 0.0096 | 1.014 (1.003–1.025) | | |
| FR | 0.38 | 1.146 (0.845–1.555) | 0.633 (0.60–0.67) ^o ‡ | 1.52•10⁻⁶ |

^aEl modelo de referencia incluyen las variables edad, sexo y la FR, obteniendo una AUROC = 0.5. *En el modelo predictivo genético incluimos las siguientes variables edad, género y FR, más 8 SNPs** que muestran una asociación significativa con la respuesta a fármacos anti-TNF, en el modelo genético ($P < 0.10$). Este análisis se realizó en una población de 1032. ^oPrueba LR (en negrita) informa que el modelo que incluía las variables genéticas presenta mayor capacidad predictiva que el modelo de referencia (prueba $-2\log LR$, $df = 6$, $P = 1.52 \cdot 10^{-6}$). Desviación residual (modelo de referencia): 1311.3; Desviación residual ("Modelo relevante de SNP": 1269.6. [‡]Los datos predictivos de este modelo presenta un valor de AUC sistemáticamente más alto que los observados en 50.000 modelos aleatorizados: AUC promedio de distribución nula (50.000 modelos) = 0.5752. Puntaje Z-score = 6.35, $P_{Z_score_value_ (50,000perm)} = 1.06 \cdot 10^{-10}$.

Figura 32. Análisis de la curva ROC. En esta curva se resumen la capacidad predictiva de casa modelo en particular.



Las curvas ROC resumen la precisión de la predicción para cada modelo en particular. El modelo genético que incluía las variables demográficas y clínicas y los SNPs asociados significativamente con la respuesta a fármacos anti-TNF (ya sea en los análisis de SNP único o de haplotipo) (marcadas en azul) mostró una capacidad predictiva significativamente mayor que el modelo de referencia (marcado en rojo) con solo variables demográficas y clínicas. AUC=0.633 frente a AUC = 0.556; n=1032.

5. Discusión.

Los datos obtenidos en este trabajo de genes candidato mostraron que ninguna de las variantes relacionadas con la señalización, transporte y metabolismo de hormonas esteroideas asociaba significativamente con el riesgo a desarrollar AR. Sin embargo, en el análisis de asociación con respuesta terapéutica observamos que el locus *CYP3A4* podría estar implicado en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF. En el meta-análisis de la población REpAIR con las poblaciones de replicación incluidas en los registros de DREAM y DANBIO encontramos que los pacientes portadores del alelo C para la variante *CYP3A4*_{rs11773597} mostraban un descenso significativamente mayor en el DAS28 que los portadores del genotipo de referencia (GG). La asociación se mantenía significativa incluso tras el ajuste por múltiples comparaciones, lo que sugería que este polimorfismo modula la respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes con AR. El gen *CYP3A4* pertenece a un amplio grupo de citocromos (*CYP3A5*, *CYP3A7*, y *CYP3A43*) que están localizados en una corta región de 0.2Mb en el cromosoma 7q21 y cataliza una de las enzimas más importantes en la oxidación endógena y exógena en la

hormonas esteroideas y está implicada en el metabolismo de una amplia variedad de fármacos [468, 469]. Teniendo en cuenta estos datos, es plausible sugerir que un SNP o un haplotipo específico en la región 5'-UTR del gen podría estar regulando directa o indirectamente la expresión génica de su ARNm y, por tanto, influir en la respuesta a fármacos anti-TNF a través de la modulación de los niveles de hormonas esteroideas y, consecuentemente, ciertas vías relacionadas con la respuesta inmunitaria. En línea con esta hipótesis, encontramos que el alelo *CYP3A4*_{rs11773597C} está fuertemente correlacionado con altos niveles de expresión del ARNm del gen *TRIM4*, un gen que recientemente se ha identificado en un GWAS como un factor regulador de los niveles de hormonas esteroideas [470]. Asimismo, importantes estudios experimentales han demostrado que la sobreexpresión del ARNm del gen *TRIM4* induce la activación de rutas proinflamatorias muy relevantes en la patología de la AR como son las vías de señalización del NFκB y el INFγ [471] y activa la liberación de las principales citocinas proinflamatorias (IL6, TNFα, IFNγ e IL1) [472, 473] que, a su vez, determina los niveles de ARNm y proteína del CYP3A4. Sin embargo, aunque resulta tentador plantearlo, nuestros datos no pueden asegurar que la variante *CYP3A4*_{rs11773597} sea un SNP causal y, por tanto, creemos que es necesario realizar un mapeo fino de esta región junto con una mejor caracterización del impacto funcional de este polimorfismo o un haplotipo que lo incluya sobre la respuesta a fármacos anti-TNF.

Otro resultado interesante de este trabajo fue la asociación de los SNPs en *ESR2* y *CYP2C9* con la respuesta a fármacos anti-TNF. El efecto más relevante fue la asociación del haplotipo *ESR2*_{GGG} con una menor probabilidad de fracaso terapéutico tras el tratamiento con fármacos anti-TNF. Esta asociación permanecía significativa incluso tras la corrección por comparaciones múltiples lo que, junto con la fuerte correlación de los SNPs en *ESR2* con la expresión de su ARNm [474], sugería una implicación de este gen en la respuesta a fármacos anti-TNF y la progresión de la AR, probablemente a través de la modulación de las respuestas inmunológicas dependientes de estrógenos.

El gen *ESR2* se encuentra en el cromosoma 14q23.2 y codifica para el receptor de estrógenos β que está altamente expresado en células sinoviales [475] y en el hueso [476], pero además en la mayor parte de las células inmunitarias [477]. Un estudio observacional ha sugerido que los estrógenos participan protegiendo las articulaciones y que su exceso contribuyen a mantener la densidad ósea [478], protegiendo frente a la AR [90, 479]. De este modo, se ha descrito que la retirada de los estrógenos aumenta la incidencia de AR [356] y su severidad [480]. Los principales estudios biológicos además han demostrado que los estrógenos están involucrados en el control de las vías Th1 y Th2 en AR directamente a través de los elementos de respuesta de estrógenos o indirectamente mediante la interacción del ESR2 con factores de transcripción como el NFκB y el AP1 [380]. Además, se ha descrito que los estrógenos están implicados en la modulación de una amplia variedad de mecanismos inmunitarios incluyendo la maduración de timocitos [481], el tráfico celular [482], la

proliferación de las células B y T [483] y expresión de moléculas de adhesión a través de mecanismos dependientes de sus receptores [483]. Por otra parte, se ha descrito que los estrógenos son capaces de estimular la actividad de las células B mediante la supresión de la respuesta inmunitaria dependiente de células T y la inhibición de la apoptosis en células B autorreactivas [484], pero, además, a través de la promoción de la vía Th2 [485] y la inhibición de células Th17 [486], que son factores esenciales en la autoinmunidad sistémica y tisular. Toda esta información sugiere que la presencia de polimorfismos en el locus *ESR2* podrían contribuir a la modulación del efecto de los estrógenos sobre el sistema inmunitario y, de ese modo, influenciar la respuesta a fármacos anti-TNF y la severidad de la enfermedad.

Finalmente, este trabajo confirmó que la presencia de la variante *CYP2C9*_{rs1799853} influía negativamente en la respuesta a fármacos anti-TNF. Así, cada copia adicional del alelo *CYP2C9*_{rs1799853T} disminuía la probabilidad de tener una caída significativa en el DAS28 tras el tratamiento con fármacos anti-TNF. El gen *CYP2C9* forma parte de un cluster en una pequeña región de aproximadamente 500 kb en el cromosoma 10q24 y cataliza la desintoxicación de muchos carcinógenos y la hidroxilación de una amplia gama de fármacos, incluidos los anti-estrógenos [487]. El SNP *CYP2C9*_{rs1799853} es una variante exónica que altera la secuencia de aminoácidos (Arg144Cys) lo que parece disminuir la actividad enzimática y, en consecuencia, el metabolismo de ciertos medicamentos [488]. Aunque la asociación de este marcador con la respuesta a fármacos anti-TNF no era significativa tras la corrección por el test de comparaciones múltiples, nos parece plausible sugerir que este marcador podría influir sobre el metabolismo de los fármacos anti-TNF y, por tanto, afectar a su eficacia para tratar la AR. Considerando que este es el primer estudio que muestra un vínculo entre el gen *CYP2C9* y la respuesta a fármacos anti-TNF, creemos que es necesario realizar estudios adicionales que confirmen o descarten esta hipótesis, y para evaluar si el efecto del gen *CYP2C9* está directamente implicado sobre el metabolismo de los fármacos anti-TNF, o sí, alternativamente, influye sobre el metabolismo de las hormonas esteroides.

Aunque este fue un estudio con un poder estadístico suficiente (80%) para detectar asociaciones con una OR de 1.21 o 1.57 para un SNP con un MAF de 0.25 en el análisis del riesgo y la respuesta a fármacos anti-TNF, es necesario reconocer que el efecto relativamente modesto encontrado para las variantes de los genes *CYP3A4*, *CYP2C9* y *ESR2* podrían ser debido al tamaño limitado de la población. Con el objetivo de seguir analizando el papel de estos genes en la respuesta a fármacos anti-TNF, comparamos la capacidad de un modelo genético construido con los SNPs asociados con la respuesta a fármacos anti-TNF con la del modelo de referencia. Los resultados mostraron que la inclusión en el análisis de solo 8 SNPs en los genes *CYP3A4*, *ESR2*, *CYP2C9*, *GSTP1*, *ESR1* y *NR1I2* mejoraba sustancialmente la capacidad para predecir la respuesta a fármacos anti-TNF. El AUC para el modelo genético fue ~7% mayor que para el modelo de referencia, lo que ponía de relevancia la necesidad de considerar los polimorfismos en

los genes que codifican para las enzimas metabolizadoras de fase I y II y los receptores de hormonas para predecir la respuesta a fármacos anti-TNF. Teniendo en cuenta la falta de marcadores clínicos precisos para prevenir la respuesta a medicamentos anti-TNF [489], el modesto valor predictivo de estos SNPs, si pudiera ser validado, junto con aquellos identificados en GWAS [335, 456, 490-493], podría ser de utilidad para estratificar a los pacientes de AR e identificar tratamientos personalizados y estrategias de seguimiento adaptadas para cada paciente. No obstante, es necesario remarcar que un modelo predictivo que aumenta solo un 7% la capacidad de predecir la respuesta a fármacos anti-TNF aún está muy lejos de poder aplicarse en el contexto clínico. Estudios adicionales incluyendo probablemente marcadores asociados con respuesta a nivel GWAS podría ayudar a mejorar la capacidad de predecir la respuesta a las terapias biológicas con fármacos anti-TNF.

Analizar el papel de los polimorfismos relacionados con el transporte, metabolismo y señalización de las hormonas esteroideas y otros receptores implicado en la respuesta inmunitaria para la determinar progresión de la enfermedad.

ARTÍCULO Nº 2. Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REPAIR consortium.

José M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Luz Canet, Rob ter Hors, Olivier Bakker, Alfons A. den Broeder, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhão, Ana Rodríguez-Ramos, Carmen Belén Lupiañez, María José Soto-Pino, Antonio García, Eva Pérez-Pampín, Alfonso González-Utrilla, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Romana T. Netea-Maier, Miguel Ángel Ferrer, Eduardo Collantes-Estévez, Miguel Ángel López Nevot, Yang Li, Manuel Jurado, João E. Fonseca Mihai G. Netea, Marieke J.H. Coenen & Juan Sainz. **Scientific Report. Sep 2019.** <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51255-0>.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC
REPORTS
nature research

OPEN

Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REPAIR consortium

Received: 24 January 2019
Accepted: 28 September 2019
Published online: 15 October 2019

Jose M. Sánchez-Maldonado^{1,2}, Rafael Cáliz^{1,2,3}, Luz Canet¹, Rob ter Hors⁴, Olivier Bakker⁵, Alfons A. den Broeder⁶, Manuel Martínez-Bueno⁷, Helena Canhão⁸, Ana Rodríguez-Ramos⁹, Carmen B. Lupiañez¹, María José Soto-Pino³, Antonio García¹, Eva Pérez-Pampín⁹, Alfonso González-Utrilla¹, Alejandro Escudero¹⁰, Juana Segura-Catena¹, Romana T. Netea-Maier⁴, Miguel Ángel Ferrer¹, Eduardo Collantes-Estévez¹⁰, Miguel Ángel López Nevot¹¹, Yang Li⁵, Manuel Jurado^{1,2}, João E. Fonseca^{12,13}, Mihai G. Netea^{4,14}, Marieke J. H. Coenen¹⁵ & Juan Sainz^{1,2}

Here, we assessed whether 41 SNPs within steroid hormone genes associated with erosive disease. The most relevant finding was the rheumatoid factor (RF)-specific effect of the *CYP11B1*, *CYP2C9*, *ESR2*, *FcyR3A*, and *SHBG* SNPs to modulate the risk of bone erosions ($P = 0.004$, 0.0007 , 0.0002 , 0.013 and 0.015) that was confirmed through meta-analysis of our data with those from the DREAM registry ($P = 0.000081$, 0.0022 , 0.00074 , 0.0067 and 0.0087 , respectively). Mechanistically, we also found a gender-specific correlation of the *CYP2C9*_{rs1799853/rs179171} genotype with serum vitamin D3 levels ($P = 0.00085$) and a modest effect on IL1 β levels after stimulation of PBMCs or blood with LPS and PHA ($P = 0.0057$ and $P = 0.0058$). An overall haplotype analysis also showed an association of 3 *ESR1* haplotypes with a reduced risk of erosive arthritis ($P = 0.009$, $P = 0.002$, and $P = 0.002$). Furthermore, we observed that the *ESR2*, *ESR1* and *FcyR3A* SNPs influenced the immune response after stimulation of PBMCs or macrophages with LPS or Pam3Cys ($P = 0.002$, 0.0008 , 0.0011 and 1.97×10^{-3}). Finally, we found that a

1. Características de la población de estudio.

Este estudio los pacientes con erosiones óseas presentaban una edad media similar a los pacientes sin erosiones (59.66 ± 12.47 vs. 58.95 ± 14.30 , $P=0.50$) y tenían una ratio entre mujeres y hombres ligeramente superior a la observada en los pacientes sin erosiones ($462/105 = 4.4$ vs. $182/67 = 2.71$, $P=0.007$; Tabla 21). El porcentaje de los pacientes con FR y anti-CCP positivos fue del 70.58% y 72.80%, respectivamente y estos porcentajes fueron ligeramente más altos entre los pacientes con enfermedad erosiva (72.52% y 74.21%) que en los pacientes que no tenían erosiones (66.12% y 69.39%). El periodo medio de seguimiento de los pacientes con AR estuvo en torno a los 18 años y el valor basal medio de DAS28 fue de 5.63. Seiscientos tres pacientes recibieron MTX (79.24%) y 632 pacientes (77.45%) fueron tratados con terapias biológicas anti-TNF. A continuación, se muestran los datos demográficos y clínicos de los pacientes de la cohorte de REpAIR y del registro DREAM incluidas en este estudio (Tabla 22 y Tabla 23, respectivamente). Con la excepción del género, ningún parámetro clínico fue significativamente diferente entre los pacientes con y sin erosiones óseas.

Progresión definida como la aparición de enfermedad erosiva (n=816)

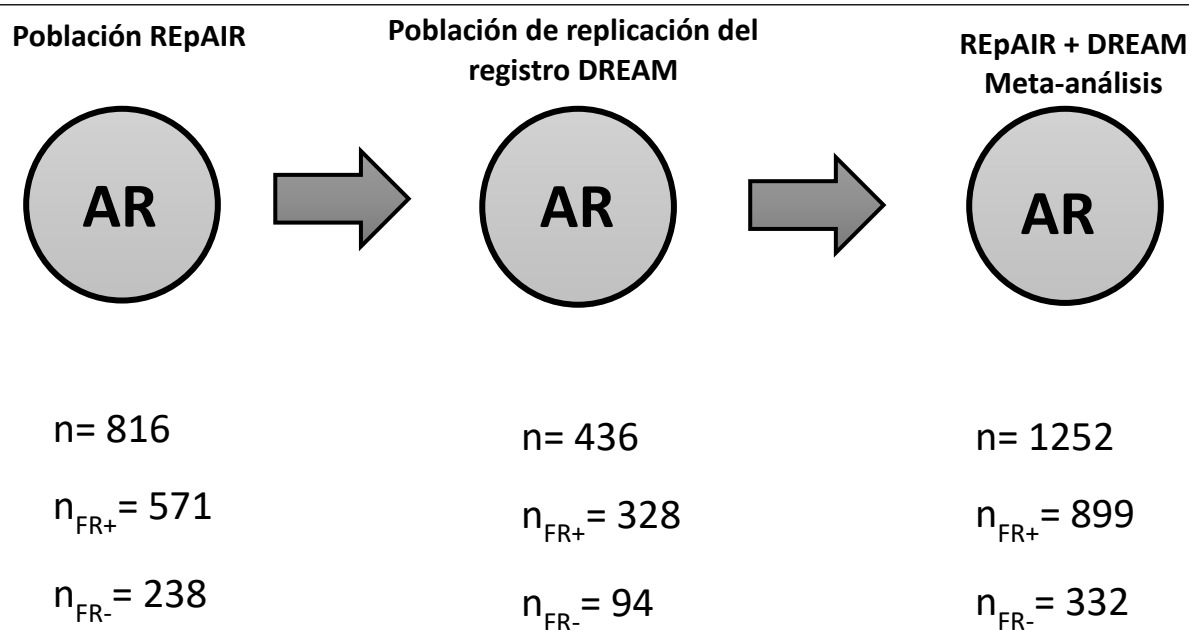


Tabla 22. Datos demográficos y clínicos globales y estratificados por la presencia de erosiones de los pacientes

| | Población REpAIR, población total | Población REpAIR, pacientes con erosiones | Población REpAIR, pacientes sin erosiones |
|--|--------------------------------------|--|--|
| Características Demográficas | n=816 | n=567 | n=249 |
| Edad (años) | 59.32±13.11 | 59.66±12.47 | 59.02±13.11 |
| Ratio del Género (mujer/hombre) | 3.74 (644/172) | 4.4 (462/105) | 3.7 (239/65) |
| Evaluación Clínica | | | |
| FR-positivo* (%) | 571 (70.58) | 409 (72.52) | 162 (65.06) |
| Anti-CCP-positivo* (%) | 490 (72.80) | 354 (74.21) | 136 (54.62) |
| DAS28 en estado basal | 5.63±2.40 | 5.57±1.18 | 5.63±2.40 |
| Duración de la enfermedad (años) | 18.30±9.34 | 19.43±9.00 | 18.30±9.34 |
| % de pacientes con enfermedad erosiva | 567 (69.49) | 567 (100.0) | 249 (100.0) |
| % de pacientes con tratamiento biológico | 632 (77.45) | 448 (79.01) | 184 (73.89) |
| Tratamientos | | | |
| DMARDs en primera línea | | | |
| Metotrexato (%) | 603 (79.24) | 415 (79.20) | 188 (79.20) |
| Primera Agente Biológico | | | |
| Infliximab (%) | 271 (42.88) | 221 (44.02) | 50 (20.08) |
| Etanercept (%) | 176 (27.85) | 134 (26.69) | 42 (16.87) |
| Adalimumab (%) | 157 (24.84) | 126 (25.10) | 31 (12.45) |
| Golimumab (%) | 11 (1.74) | 7 (01.39) | 4 (1.61) |
| Abatecept (%) | 5 (0.79) | 4 (00.80) | 1 (0.40) |
| Tocilizumab (%) | 4 (0.63) | 2 (00.40) | 2 (0.80) |
| Rituximab (%) | 8 (1.27) | 8 (01.59) | 0 (0.00) |

Tabla 23. Datos demográficos y clínicos globales y estratificados por la presencia de erosiones de los pacientes

| | Registro DREAM, población replicación total | Registro DREAM, pacientes con erosiones | p |
|--|--|--|---|
| Características Demográficas | (n=436) | (n=307) | |
| Edad (años) | 53.59±12.84 | 53.63±10.17 | |
| Ratio del Género (mujer/hombre) | 2.06 (294/143) | 2.13 (209/98) | |
| Evaluación Clínica | | | |
| FR-positivo* (%) | 328 (77.72) | 235 (78.33) | |
| Anti-CCP-positivo* (%) | 90 (58.06) | 64 (58.72) | |
| DAS28 en estado basal | 5.24±1.27 | 5.27±1.23 | |
| Duración de la enfermedad (años) | 9.00±9.87 | 9.17±10.17 | |
| % de pacientes con enfermedad erosiva | 307 (70.41) | 307 (100.0) | |
| % de pacientes con tratamiento biológico | 436 (100.00) | 307 (100.0) | |
| Tratamientos | | | |
| DMARDs en primera línea | | | |
| Metotrexato (%) | 314 (75.48) | 226 (77.13) | |
| Primera Agente Biológico | | | |
| Infliximab (%) | 106 (24.31) | 79 (25.73) | |
| Etanercept (%) | 101 (23.16) | 72 (23.45) | |
| Adalimumab (%) | 229 (52.52) | 156 (50.81) | |
| Golimumab (%) | — | — | |
| Abatecept (%) | — | — | |
| Tocilizumab (%) | — | — | |
| Rituximab (%) | — | — | |

Los datos son la media ± SD o n (%). *Datos Clínicos para 708 pacientes con AR, de los cuales tenemos ADN para genotiparlos, *FR fue evaluado en la población REPAIR, DREAM y DANBIO Registry, respectivamente. Anti-CCP (Anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados de la enfermedad), DMARDs (medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), ND (datos no determinados o desconocidos)

2. Análisis de asociación y análisis de Haplotipos.

Los 41 polimorfismos incluidos en el estudio no mostraron desviación del HWE en la población de control ($P=0.001$; Tabla 24).

Tabla 24. Lista de los 41 SNPs en genes relacionados con la señalización, transporte y metabolismo de hormonas esteroideas.

| Genes | Cr. | dbSNP rs# | Sustitución Nucleótidos | Efecto alélico | Localización |
|----------------|-----|------------|-------------------------|----------------|---------------|
| <i>CYP1A1</i> | 15 | rs1799814 | A/C | A | T461N |
| <i>CYP1A2</i> | 15 | rs762551 | A/C | A | Intrónico |
| <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 | cerca del gen |
| <i>CYP2C19</i> | 10 | rs4244285 | A/G | A | P227P |
| <i>CYP3A4</i> | 7 | rs2740574 | T/C | T | cerca del gen |
| <i>CYP3A4</i> | 7 | rs11773597 | C/G | C | cerca del gen |
| <i>CYP17A1</i> | 10 | rs743572 | A/G | G | 5'-UTR |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs851984 | G/A | A | Intrónico |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs2881766 | G/T | T | Intrónico |
| <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 | Intrónico |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs2234693 | C/T | C | Intrónico |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs9340799 | A/G | A | Intrónico |
| <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 | cerca del gen |
| <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 | cerca del gen |
| <i>FcyR2A</i> | 1 | rs1801274 | A/G | G | H131R |
| <i>FcyR3A</i> | 1 | rs396991 | A/C | C | V158F |
| <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 | cerca del gen |
| <i>NR1I2</i> | 3 | rs1464603 | C/T | C | Intrónico |
| <i>NR1I2</i> | 3 | rs6785049 | A/G | G | Intrónico |
| <i>NR1I2</i> | 3 | rs2276707 | C/T | T | Intrónico |
| <i>NR1I2</i> | 3 | rs1054191 | A/G | A | 3'-UTR |
| <i>PGR</i> | 11 | rs1042838 | C/A | A | V660L |
| <i>PGR</i> | 11 | rs1379130 | A/G | A | G393G |
| <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 |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un único nucleótido; MAF, frecuencia del alelo de menor; UTR: región no traducida.

El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo y país de origen reveló que los pacientes que portaban el genotipo *ESR2*_{rs1271572T/T} tendían a tener un menor riesgo a desarrollar enfermedad erosiva que los pacientes portadores del alelo G (OR=0.55, $P=0.004$; Tabla 25). Aunque la asociación de esta variante era solo marginal tras la

corrección con el test de comparaciones múltiples, encontramos un efecto dependiente del FR de este marcador genético para modular el riesgo a desarrollar erosiones. Los pacientes seropositivos que portaban el genotipo $ESR2_{rs1271572T/T}$ tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar erosiones ($OR=0.38$, $P=0.0002$) mientras que en los pacientes seronegativos el efecto de este marcador era opuesto, pero estadísticamente no significativo ($OR=1.08$, $P=0.83$, $P_{Interacción}=0.018$; Tabla 24). Cabe destacar que la asociación del SNP $ESR2_{rs1271572}$ con un menor riesgo a desarrollar erosiones óseas en pacientes seropositivos se mantenía significativo incluso tras considerar el número de comparaciones totales realizadas ($P<0.00074$). Aunque esta asociación no se pudo replicar en la población del registro DREAM, cuando meta-analizamos ambas poblaciones ($n=1252$) se pudo confirmar que los pacientes seropositivos que presentan el genotipo $ESR2_{rs1271572T/T}$ tenían un menor riesgo de desarrollar erosiones ($OR_{FR+}=0.52$, $P=0.00074$) que los pacientes seronegativos en los que se observaba un efecto totalmente opuesto, aunque no estadísticamente significativo ($OR_{FR-}=1.28$, $P=0.42$, $P_{Heterogeneidad}=0.33$; Tabla 26). Curiosamente, no encontramos ningún efecto de este marcador cuando los análisis fueron estratificados por anti-CCP, lo que sugería que el gen $ESR2$ podría jugar un papel relevante en la determinación de la progresión de la enfermedad a través de algún mecanismo dependiente del FR. En línea con esta hipótesis, encontramos un efecto dependiente del FR para el haplotipo $ESR2_{CGTA}$ sobre el riesgo de desarrollar erosiones óseas. Así, pacientes seropositivos que portaban el haplotipo $ESR2_{CGTA}$ (que no incluía el alelo protector para la variante $ESR2_{rs1271572}$) tenían un mayor riesgo de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+}=1.63$, $P=0.0051$) mientras que el efecto del haplotipo era inverso y no significativo en los pacientes seronegativos ($OR_{FR-}=0.93$, $P=0.99$). El análisis global de haplotipos incluyendo 1252 individuos de la población REpAIR y el registro DREAM confirmó un efecto específico de FR para el haplotipo $ESR2_{CGTA}$ con un mayor riesgo de desarrollar erosiones en pacientes seropositivos ($OR_{FR+}=1.44$, $IC95\%$ 1.13–1.84, $P=0.0036$ y $OR_{FR-}=0.89$, 95% CI 0.62–1.26, $P=0.51$). Según los datos de las plataformas públicas GTEx y Haploreg que indican una fuerte correlación de la variante $ESR2_{rs1271572}$ (y otras variantes del haplotipo) con los niveles de expresión de ARNm de $ESR2$ en sangre periférica completa ($P=3.1\cdot 10^{-9}$), pero también en células B primarias, líneas celulares linfoblastoides (de $P=1.98\cdot 10^{-6}$ a $P=3.47\cdot 10^{-10}$) y varios tejidos (que van de $P=2.60\cdot 10^{-5}$ a $P=8.33\cdot 10^{-23}$), podemos sugerir que el polimorfismo $ESR2_{rs1271572}$ o el haplotipo $ESR2_{CGTA}$ podrían representar un eQTL para $ESR2$.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron un efecto dependiente del FR para las variantes $CYP2C9_{rs1799853}$ y $CYP1B1_{rs10012}$ sobre el riesgo de desarrollar erosiones óseas. Los pacientes seropositivos que portaban los genotipos $CYP2C9_{rs1799853T/T}$ o $CYP1B1_{rs10012G/G}$ tenían una probabilidad significativamente menor de desarrollar erosiones óseas ($OR=0.16$, $P=0.0007$ y $OR=0.42$, $P=0.0040$) mientras que en pacientes seronegativos el efecto era opuesto, pero no significativo ($OR=2.71$, $P=0.23$, $P_{Interacción}=0.003$ y $OR=1.70$, $P=0.35$, $P_{Interacción}=0.031$; Tabla 25). El efecto del

polimorfismo *CYP2C9*_{rs1799853} sobre el riesgo de desarrollar enfermedad erosiva en pacientes seropositivos se mantuvo dentro de los límites de la significación incluso tras la corrección por múltiples comparaciones ($P < 0.00074$), lo que sugería un papel del gen *CYP2C9* en la modulación de la progresión de la enfermedad. De acuerdo con estos datos, encontramos que los pacientes seropositivos que portaban el haplotipo *CYP2C9*_{AT} tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 0.61$, $P = 0.0075$) mientras que no se observaba efecto alguno en los pacientes seronegativos ($OR_{FR-} = 0.87$, $P = 0.57$). Al igual que ocurría con el *ESR2*, no se observó efecto alguno de los polimorfismos en los genes *CYP2C9* y *CYP1B1* cuando los análisis se estratificaron por anti-CCP, lo que sugería que el efecto de esos loci sobre la aparición de erosiones podría estar guiado por la presencia de FR. Es importante destacar que cuando intentamos validar la asociación dependiente del FR del genotipo *CYP1B1*_{rs10012G/G} encontramos que los pacientes seropositivos que portaban ese genotipo tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 0.30$, $P = 0.0051$) y se confirmó el efecto opuesto y no significativo en pacientes seronegativos ($OR_{FR-} = 5.97$, $P = 0.10$, $P_{Interacción} = 0.012$; Tabla 25). El meta-análisis de las poblaciones de REpAIR y DREAM confirmó el fuerte efecto específico del FR del SNP en *CYP1B1* para determinar el riesgo de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 0.38$, $P = 0.000081$, $P_{Heterogeneidad} = 0.52$ vs. $OR_{FR-} = 2.22$, $P = 0.11$, $P_{Heterogeneidad} = 0.31$). Aunque, intentamos validar también la asociación del genotipo *CYP2C9*_{rs1799853T/T} con un menor riesgo a desarrollar enfermedad erosiva, el tamaño relativamente pequeño de la población de replicación no nos permitió realizar el análisis de asociación de acuerdo con el modelo de herencia recesivo. Sin embargo, encontramos un efecto específico del FR sobre el riesgo de tener enfermedad erosiva para un SNP vecino, el rs1057910, lo que sugería un efecto dependiente del FR del locus *CYP2C9* para modular el riesgo a desarrollar erosiones ($OR_{FR+} = 2.75$, $P = 0.027$ vs. $OR_{FR-} = 0.54$, $P = 0.47$; Tabla 26). El meta-análisis de ambas cohortes confirmó también el efecto específico de FR del SNP *CYP2C9*_{rs1057910} sobre el riesgo de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 2.68$, $P = 0.0022$ vs. $OR_{FR-} = 1.08$, $P = 0.83$, $P_{Heterogeneidad} = 0.34$; Tabla 26). En línea con estos hallazgos, observamos un efecto modificador del FR sobre la asociación de las variantes *FcγR3A*_{rs396991} y *SHBG*_{rs6259} con el riesgo de tener erosiones. Pacientes seronegativos portadores del alelo *FcγR3A*_{rs396991C} tenían una probabilidad significativamente menor de desarrollar erosiones óseas ($OR = 0.45$, $P = 0.013$) mientras que en los pacientes seropositivos se observaba un efecto opuesto y no significativo ($OR = 1.18$, $P = 0.46$, $P_{Interacción} = 0.028$; Tabla 25). Además, observamos que los pacientes seropositivos que portaban el alelo *SHBG*_{rs6259A} mostraban un mayor riesgo a desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 1.87$, $P = 0.015$) mientras un efecto opuesto y no significativo se observaba en pacientes seronegativos ($OR_{FR-} = 0.66$, $P = 0.19$). Curiosamente, aunque el efecto fue más fuerte en pacientes seronegativos, pudimos validar el efecto específico del FR del polimorfismo *SHBG*_{rs6259} sobre el riesgo de desarrollar erosiones en la población de replicación ($OR_{FR+} = 1.17$, $P = 0.63$ vs. $OR_{FR-} = 0.22$, $P = 0.009$, $P_{Interacción} = 0.013$; Tabla 26).

Como cabía esperar, el meta-análisis de ambas cohortes confirmó que el efecto de este marcador dependía específicamente del FR ($OR_{FR+}=1.55$, $P=0.033$ vs. $OR_{FR-}=0.48$, $P=0.0087$, $P_{Heterogeneidad}=0.14$; Tabla 26). Aunque no pudimos validar la asociación dependiente de FR para el otro SNP, el *FcγR3A*_{rs396991}, en la población del registro DREAM, el meta-análisis de ambas cohortes confirmó el efecto específico del FR de este SNP para modular el riesgo a desarrollar enfermedad erosiva ($OR_{FR-}=0.47$, $P=0.0067$ vs. $OR_{FR+}=1.02$, $P=0.93$). El efecto de ninguno de estos dos SNPs se vio alterado por la presencia de anti-CCP, lo que de nuevo sugería que el FR influye en como los genes relacionados con las hormonas esteroideas determinan la progresión de la enfermedad en la AR.

Finalmente, el análisis de asociación global además reveló que los portadores del alelo *ESR1*_{rs1801132G} tenían un menor riesgo de desarrollar erosiones óseas ($OR=0.71$, $P=0.034$). Aunque no pudimos validar esta asociación en la población de replicación, encontramos que este SNP tenía un efecto específico del FR para modular el riesgo de desarrollar erosiones óseas de acuerdo a un modelo recesivo. Así, los pacientes seropositivos portadores del genotipo *ESR1*_{rs1801132G/G} tenían un menor riesgo de desarrollar erosiones óseas ($OR_{FR+} = 0.39$, $P = 0.004$) mientras un efecto opuesto y no significativo se observó en pacientes seronegativos ($OR_{FR-}=1.43$, $P=0.57$; Tabla 26). Además, encontramos un efecto específico del FR similar para el SNP *ESR1*_{rs9340799} que no se detectó en la población REPAIR ($OR_{FR+}= 0.42$, $P=0.009$ vs $OR_{FR-}= 8.33$, $P=0.011$). Teniendo en cuenta que ninguna de estas asociaciones sobrevivía después de la corrección por comparaciones múltiples y que el efecto de los SNP *ESR1* sobre el riesgo de desarrollar enfermedad erosiva parecía depender del modelo de herencia aplicado, podemos sugerir que relación entre el locus *ESR1* y la erosión ósea probablemente esté mediado por más de un marcador genético. En línea con esta hipótesis, observamos que 3 haplotipos para el gen *ESR1* (*ESR1*_{CTATTTCTA}, *ESR1*_{CTATTCTCA} y *ESR1*_{GTATTCTCA}) asociaban significativamente con un menor riesgo a tener erosiones ($P=0.0094$, $P=0.0021$ y $P=0.0023$, respectivamente).

Tabla 25. Asociación de la población REpAIR y estratificada por FR entre los polimorfismos relacionados con riesgo a tener erosiones óseas.

| Genes | REpAIR (n=816) | | | | Pacientes FR-positivos (n=571) | | Pacientes FR-positivos (n=571) |
|----------------|----------------|----------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|
| | ID SNP | Efecto alélico | OR (95% CI)† | P | OR (95% CI)† | P | |
| CYP1A1 | rs1799814 | A | 0.85 (0.52-1.39) | 0.52 | 0.82 (0.43-1.54) | 0.53 | 0.98 (0.43-2.28) |
| CYP1A2 | rs762551 | C | 0.91 (0.66-1.25) | 0.57 | 0.72 (0.48-1.09) | 0.12 | 1.37 (0.83-2.25) |
| CYP1B1 | rs1800440 | G | 1.06 (0.76-1.46) | 0.74 | 1.12 (0.74-1.69) | 0.60 | 0.97 (0.53-1.77) |
| CYP1B1 | rs1056836 | G | 0.92 (0.64-1.32) | 0.66 | 1.04 (0.67-1.63) | 0.85 | 0.66 (0.33-1.31) |
| CYP1B1 | rs10012 | G | 0.62 (0.37-1.04)§ | 0.071 | 0.42 (0.23-0.76)§ | 0.004 | 1.70 (0.50-5.99) |
| CYP2C9 | rs1799853 | T | 0.45 (0.20-1.02)§ | 0.056 | 0.16 (0.06-0.46)§ | 0.0007 | 2.71 (0.53-13.9) |
| CYP2C9 | rs1057910 | C | 1.68 (0.98-2.89) | 0.059 | 2.63 (1.15-6.03) | 0.012 | 1.28 (0.53-3.11) |
| CYP2C19 | rs12248560 | T | 1.04 (0.75-1.44) | 0.83 | 1.09 (0.72-1.65) | 0.70 | 0.96 (0.53-1.73) |
| CYP2C19 | rs4244285 | A | 1.00 (0.69-1.44) | 0.99 | 1.02 (0.64-1.61) | 0.94 | 0.90 (0.44-1.84) |
| CYP3A4 | rs2740574 | G | 1.57(0.90-2.74) | 0.11 | 3.12 (1.29-7.55) | 0.004 | 0.70 (0.22-2.23) |
| CYP3A4 | rs11773597 | C | 1.19 (0.77-1.84) | 0.43 | 1.33 (0.74-2.38) | 0.35 | 1.00 (0.53-1.88) |
| CYP17A1 | rs743572 | G | 0.92 (0.66-1.28) | 0.63 | 0.99 (0.65-1.50) | 0.97 | 0.82 (0.44-1.53) |
| ESR1 | rs851984 | T | 1.07 (0.78-1.46) | 0.68 | 0.82 (0.55-1.24) | 0.35 | 1.56 (0.91-2.67) |
| ESR1 | rs2881766 | G | 1.00 (0.72-1.39) | 0.99 | 1.08 (0.71-1.65) | 0.71 | 0.83 (0.44-1.53) |
| ESR1 | rs2071454 | G | 0.96 (0.65-1.42) | 0.82 | 1.06 (0.65-1.75) | 0.81 | 0.75 (0.33-1.70) |
| ESR1 | rs2077647 | G | 0.92 (0.65-1.30) | 0.64 | 0.70 (0.45-1.09) | 0.11 | 1.46 (0.83-2.57) |
| ESR1 | rs827421 | C | 0.95 (0.67-1.33) | 0.75 | 0.80 (0.52-1.25) | 0.33 | 1.21 (0.66-2.24) |
| ESR1 | rs2234693 | C | 1.10 (0.78-1.55) | 0.58 | 0.97 (0.62-1.51) | 0.89 | 1.33 (0.71-2.50) |
| ESR1 | rs9340799 | G | 0.97 (0.71-1.34) | 0.87 | 0.78 (0.52-1.17) | 0.23 | 1.42 (0.83-2.44) |
| ESR1 | rs1801132 | G | 0.71 (0.52-0.97) | 0.034 | 0.85 (0.57-1.27) | 0.44 | 0.53 (0.33-0.83) |

Tabla 25. Continuación.

| | | | | | | | |
|----------------|-----------|---|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------|------------------|
| ESR1 | rs3798577 | C | 1.21 (0.87-1.68) | 0.27 | 1.39 (0.92-2.10) | 0.12 | 1.12 (0.6 |
| ESR1 | rs910416 | T | 0.84 (0.59-1.19) | 0.33 | 0.75 (0.47-1.18) | 0.21 | 0.91 (0.5 |
| ESR2 | rs1255998 | G | 0.92 (0.64-1.33) | 0.67 | 1.07 (0.66-1.72) | 0.78 | 0.72 (0.3 |
| ESR2 | rs928554 | G | 0.78 (0.52-1.17) [§] | 0.23 | 0.58 (0.35-0.96)[§] | 0.035 | 1.39 (0.70 |
| ESR2 | rs4986938 | T | 1.09 (0.79-1.51) | 0.59 | 1.41 (0.93-2.11) | 0.10 | 0.74 (0.4 |
| ESR2 | rs1271572 | T | 0.55 (0.37-0.82)[§] | 0.004 | 0.38 (0.23-0.63)[§] | 0.0002 | 1.08 (0.54 |
| FCGR2A | rs1801274 | G | 1.04 (0.72-1.51) | 0.82 | 1.17 (0.74-1.86) | 0.50 | 0.83 (0.4 |
| FCGR3A | rs396991 | C | 0.90 (0.64-1.27) | 0.56 | 1.18 (0.76-1.81) | 0.46 | 0.45 (0.2 |
| GSTP1 | rs1695 | G | 1.05 (0.77-1.44) | 0.76 | 1.16 (0.77-1.75) | 0.47 | 0.70 (0.4 |
| GSTP1 | rs1138272 | T | 1.32 (0.77-2.25) | 0.31 | 1.70 (0.83-3.46) | 0.13 | 0.71 (0.2 |
| HSD17B1 | rs605059 | T | 1.12 (0.79-1.59) | 0.54 | 1.24 (0.80-1.92) | 0.33 | 1.12 (0.5 |
| NR1I2 | rs2276706 | A | 1.01 (0.74-1.40) | 0.93 | 0.96 (0.64-1.43) | 0.83 | 1.18 (0.6 |
| NR1I2 | rs1464603 | C | 1.16 (0.85-1.59) | 0.35 | 1.14 (0.76-1.69) | 0.53 | 1.45 (0.8 |
| NR1I2 | rs6785049 | G | 0.92 (0.66-1.27) | 0.60 | 0.95 (0.63-1.43) | 0.81 | 1.03 (0.5 |
| NR1I2 | rs2276707 | T | 1.03 (0.73-1.45) | 0.87 | 0.80 (0.51-1.23) | 0.31 | 1.62 (0.9 |
| NR1I2 | rs1054191 | A | 0.83 (0.59-1.17) | 0.30 | 1.02 (0.65-1.58) | 0.94 | 0.58 (0.3 |
| PGR | rs1042838 | A | 0.76 (0.53-1.08) | 0.13 | 0.74 (0.47-1.15) | 0.18 | 0.86 (0.4 |
| PGR | rs1379130 | A | 0.92 (0.66-1.26) | 0.59 | 1.02 (0.68-1.53) | 0.93 | 0.79 (0.4 |
| PGR | rs518162 | A | 1.11 (0.75-1.64) | 0.62 | 1.41 (0.83-2.39) | 0.21 | 0.64 (0.3 |
| SHBG | rs6259 | A | 1.22 (0.83-1.78) | 0.31 | 1.87 (1.11-3.14) | 0.015 | 0.66 (0.3 |
| SULT1A1 | rs9282861 | A | 1.04 (0.76-1.43) | 0.79 | 0.86 (0.58-1.29) | 0.46 | 1.38 (0.8 |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza. Los datos de FR estuvieron disponibles se ajustaron por edad, sexo y país de origen. $P < 0.05$ en negrita. [†]Resultados calculados según el modelo de herencia dominante herencia recesivo.

Tabla 26. Replicación de las mejores asociaciones de interés entre los polimorfismos relacionados con las desarrollar enfermedad erosiva y el meta-análisis.

| Genes | Registro DREAM (n=436) | | | | Registro DREAM pacientes con FR positivo (n=328) | | | |
|---------------|---------------------------|--------------|-------------------------------------|--------------|---|---------------|-------------------------|---------------|
| | ID SNP | Efecto alelo | OR (95%CI) [†] | P | OR (95%CI) [†] | P | OR (95%CI) [†] | P |
| <i>CYP1B1</i> | rs10012 | G | 0.53 (0.27-1.06) [§] | 0.073 | 0.30 (0.13-0.70)[§] | 0.0051 | 5.97 (0.27-13.2) | 0.0002 |
| <i>CYP2C9</i> | rs1799853 | T | NA (NA-NA) [§] | NA | NA (NA-NA) [§] | NA | NA (NA-NA) | NA |
| <i>CYP2C9</i> | rs1057910 | C | 1.89 (0.85-4.22) | 0.095 | 2.75 (1.03-7.35) | 0.027 | 0.54 (0.27-1.06) | 0.041 |
| <i>CYP3A4</i> | rs2740574 | G | 0.36 (0.17-0.77) | 0.008 | 0.42 (0.17-1.07) | 0.075 | 0.30 (0.13-0.70) | 0.0051 |
| <i>ESR1</i> | rs1801132 | G | 0.54 (0.31-0.96)[§] | 0.035 | 0.39 (0.20-0.76)[§] | 0.004 | 1.43 (0.67-3.04) | 0.35 |
| <i>ESR1</i> | rs9340799 | G | 0.69 (0.39-1.25) [§] | 0.23 | 0.42 (0.22-0.83)[§] | 0.009 | 8.33 (1.17-60.1) | 0.0002 |
| <i>ESR2</i> | rs1255998 | G | 2.08 (1.17-3.69) | 0.009 | 1.82 (0.94-3.54) | 0.065 | 5.41 (1.17-24.7) | 0.0002 |
| <i>ESR2</i> | rs928554 | G | 0.61 (0.37-1.00) | 0.050 | 0.59 (0.33-1.07) | 0.075 | 0.51 (0.27-1.06) | 0.041 |
| <i>ESR2</i> | rs1271572 | T | 0.90 (0.56-1.47) [§] | 0.68 | 0.78 (0.46-1.37) [§] | 0.41 | 2.16 (0.94-4.94) | 0.065 |
| <i>FCGR3A</i> | rs396991 | C | 0.74 (0.45-1.22) | 0.25 | 0.78 (0.44-1.40) | 0.41 | 0.53 (0.27-1.06) | 0.041 |
| <i>SHBG</i> | rs6259 | A | 0.86 (0.51-1.47) | 0.59 | 1.17 (0.62-2.20) | 0.63 | 0.22 (0.11-0.44) | 0.0002 |

Tabla 26. Continuación

| Genes | ID SNP | Efecto alelo | REpAIR + registro DREAM Meta-análisis Global (n=1252) | | | REpAIR + registro DREAM Pacientes FR positivo (n=899) | | | REpAIR + registro DREAM Pacientes FR negativo (n=1000) |
|---------------|-----------|--------------|---|--------------|------------------|---|-----------------|------------------|--|
| | | | OR (95% CI) [†] | P | P _{Het} | OR (95% CI) [†] | P | P _{Het} | |
| <i>CYP1B1</i> | rs10012 | G | 0.59 (0.39-0.88)[§] | 0.011 | 0.72 | 0.38 (0.23-0.61)[§] | 0.000081 | 0.52 | 2.22 (0.72-7.0) |
| <i>CYP2C9</i> | rs1799853 | T | NA (NA-NA) [§] | NA | NA | NA (NA-NA) [§] | NA | NA | NA (NA-NA) |
| <i>CYP2C9</i> | rs1057910 | C | 1.74 (1.11-2.73) | 0.015 | 0.81 | 2.68 (1.42-5.048) | 0.0022 | 0.95 | 1.08 (0.42-2.9) |
| <i>CYP3A4</i> | rs2740574 | G | 0.94 (0.60-1.46) | 0.77 | 0.002 | 1.19 (0.63-2.25) | 0.59 | 0.002 | 0.55 (0.21-1.4) |
| <i>ESR1</i> | rs1801132 | G | 0.75 (0.58-0.97) | 0.030 | 0.52 | 0.78 (0.60-1.08) | 0.13 | 0.51 | 0.72 (0.42-1.2) |
| <i>ESR1</i> | rs9340799 | G | 0.90 (0.68-1.19) | 0.45 | 0.31 | 0.73 (0.53-1.00) | 0.050 | 0.61 | 1.61 (1.03-2.5) |
| <i>ESR2</i> | rs1255998 | G | 1.16 (0.86-1.59) | 0.33 | 0.02 | 1.28 (0.87-1.89) | 0.20 | 0.20 | 0.95 (0.52-1.7) |
| <i>ESR2</i> | rs928554 | G | 0.70 (0.53-0.93) | 0.013 | 0.50 | 0.64 (0.45-0.90) | 0.013 | 0.73 | 0.77 (0.48-1.2) |
| <i>ESR2</i> | rs1271572 | T | 0.67 (0.49-0.91) | 0.011 | 0.12 | 0.52 (0.36-0.76)[§] | 0.00074 | 0.06 | 1.28 (0.62-2.6) |
| <i>FCGR3A</i> | rs396991 | C | 0.85 (0.64-1.12) | 0.24 | 0.53 | 1.02 (0.72-1.44) | 0.93 | 0.26 | 0.47 (0.21-1.0) |
| <i>SHBG</i> | rs6259 | A | 1.08 (0.79-1.48) | 0.62 | 0.29 | 1.55 (1.03-2.31) | 0.033 | 0.26 | 0.48 (0.21-1.0) |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza. Los datos de FR estuvieron disponibles en la población de replicación. El meta-análisis se realizó de acuerdo a un modelo de efectos fijos y con valores de asociación ajustados. $P < 0.05$ en negrita.

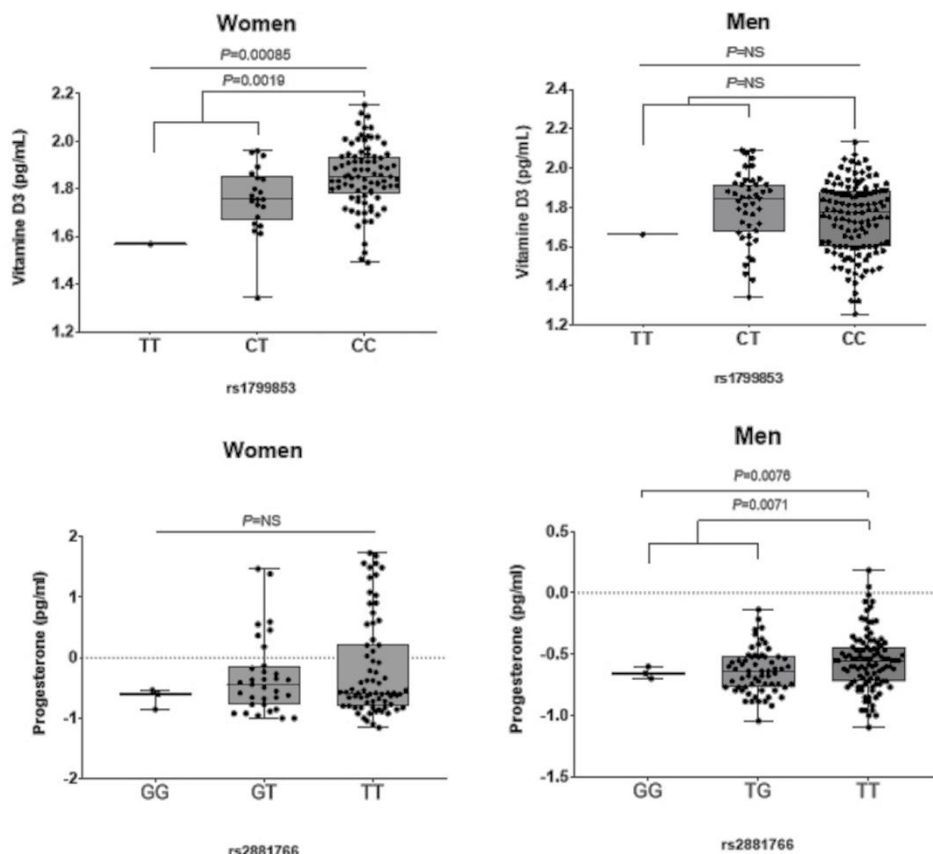
[†]Resultados calculados según el modelo de herencia dominante.

[§]Resultados calculados según el modelo de herencia recesivo.

3. Correlación de los SNPs con los niveles de las hormonas esteroideas.

Además de la fuerte asociación genética con la enfermedad erosiva y su papel conocido en el control del metabolismo de una amplia gama de medicamentos, observamos que el polimorfismo *CYP2C9*_{rs1799853} correlacionaba con los niveles séricos de vitamina D3 en mujeres ($P=0.00085$ y $P=0.0019$; Figura 33) mientras que no parecía tener efecto en los hombres. Aunque la asociación de este marcador con vitamina D3 en mujeres solo era marginalmente significativa tras la corrección por múltiples comparaciones, este hallazgo sugería que este marcador podría tener un papel en la modulación de la homeostasis ósea y en la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por vitamina D3. Por otro lado, encontramos que el genotipo *ESR1*_{rs2881766}/G o el alelo G se correlacionaban débilmente con los niveles de progesterona ($P=0.0076$ y $P=0.0071$, respectivamente) y que las siguientes variantes *ESR1*_{rs851984}, *ESR1*_{rs2077647}, *ESR1*_{rs2071454}, *ESR1*_{rs3798577} y *ESR1*_{rs910416} mapean entre sitios de unión para histonas en varios tipos celulares importantes incluyendo los osteoblastos y una amplia variedad de células inmunitarias.

Figura 33. Correlación de los SNPs *CYP2C9*_{rs1799853} y *ESR1*_{rs2881766} con la vitamina D3 y los niveles de la progesterona en mujeres (n =107) y hombres (n =172).



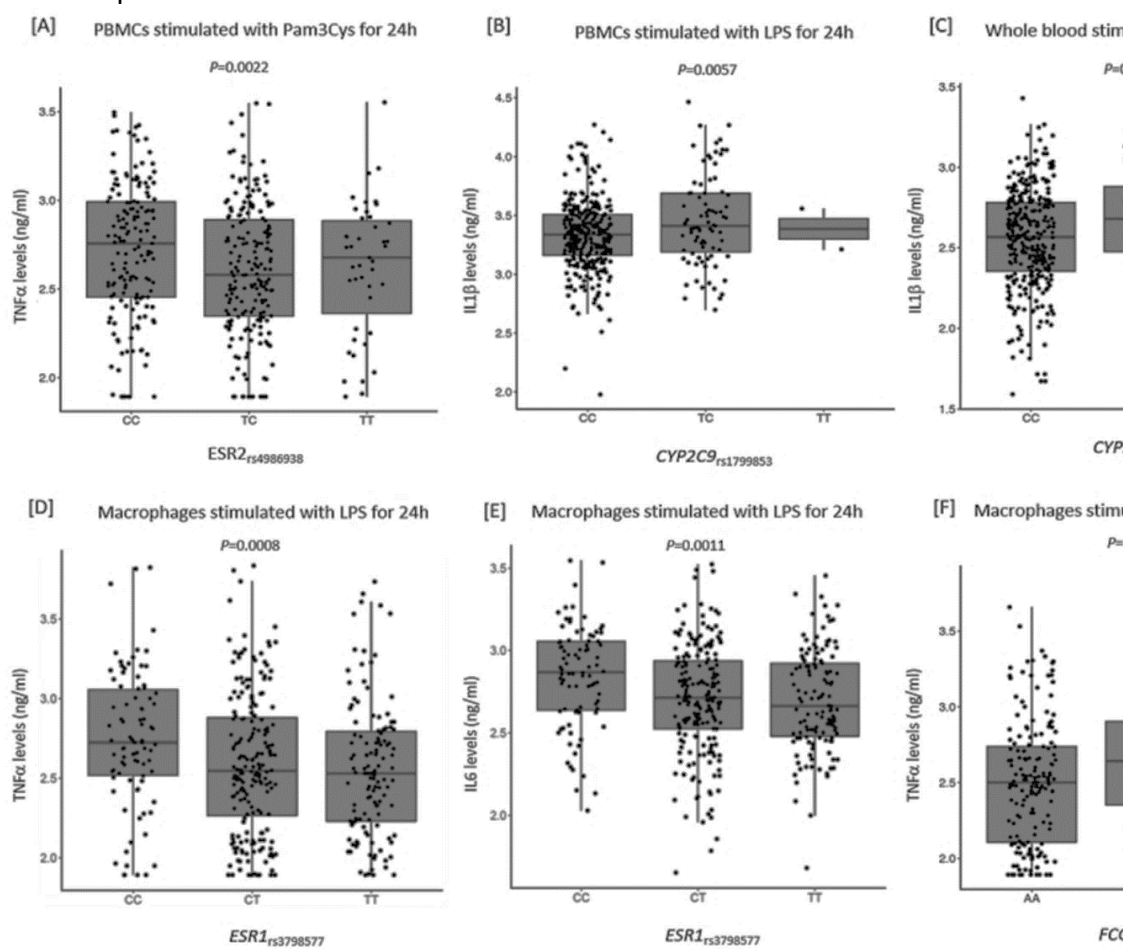
Los pacientes que tomaron anticonceptivos orales fueron excluidos del análisis. Después de transformar los datos a escala logarítmica, se analizaron los datos por regresión lineal ajustada por edad y sexo. NS; no significativo.

4. Correlación de los SNPs seleccionados con niveles de citocinas.

Cuando realizamos los análisis de correlación de los SNPs seleccionados con los niveles de citocinas (cQTL) de los experimentos de estimulación, encontramos que los portadores del alelo *ESR2*_{rs4986938T} tenía niveles reducidos de TNF α después de la estimulación de PBMCs con Pam3Cys durante 24h ($P=0.0022$; Figura 34A). Estos resultados junto con aquellos describiendo que los SNPs *ESR2*_{rs4986938} y *ESR2*_{rs1271572} mapean entre sitios de unión a histonas en múltiples tipos celulares incluyendo los osteoblastos y a diferentes subtipos de células inmunitarias, sugiere un posible papel funcional de las variantes del *ESR2* en la modulación del riesgo a desarrollar erosiones óseas, probablemente a través del control y regulación de la expresión del gen *ESR2*. Además, los ensayos de estimulación *in vitro* revelaron que la presencia del alelo *CYP2C9*_{rs1799853T} correlacionaba con una mayor producción de IL1 β tras la estimulación de PBMCs con LPS o PHA durante 24h o 48h ($P=0.0057$ y $P=0.0058$; Figura 34B y 34C), lo que también apuntaba a un papel funcional de este marcador en determinar la aparición de erosiones óseas.

Por otra parte, encontramos que la variante *ESR1*_{rs3798577} correlacionaba con los niveles de TNF α e IL6 tras la estimulación de macrófagos con LPS durante 24h ($P=0.00083$ y 0.0011 ; Figura 34D y 34E). Finalmente, encontramos que los portadores del alelo *Fc γ R3A*_{rs396991C} mostraban una producción significativamente mayor de TNF α tras la estimulación de macrófagos con LPS durante 24h ($P=1.97 \cdot 10^{-7}$; Figura 45F). Es importante además destacar que la asociación del alelo *Fc γ R3A*_{rs396991C} con mayores niveles de TNF α en los macrófagos permanecía significativa tras la corrección por múltiples comparaciones, lo que sugería que esta variante podría mediar su efecto funcional en la modulación de la respuesta inmunitaria mediadas por macrófagos, un factor que parece ser clave en el desarrollo de la enfermedad erosiva. Por el contrario, aunque era tentador especular que los SNPs *ESR1*, *ESR2*, y *CYP2C9* podrían también ejercer su efecto sobre el riesgo de desarrollar enfermedad erosiva a través de la modulación de las hormonas esteroideas o la respuesta inmunológica mediada por éstas, el efecto de estas variantes sobre la aparición de erosiones óseas no sobrevivió la corrección por comparaciones múltiples, lo que, más bien, indicaba la existencia de un impacto funcional modesto de estos polimorfismos en la enfermedad erosiva.

Figura 34. Correlación de los polimorfismos relacionado con las hormonas esteroideas con los niveles de citocinas



Correlación de los SNPs de las hormonas esteroideas con niveles de citocinas después de la estimulación de PBMCs, o

5. Análisis de modelos predictivos. Curva ROC.

Globalmente nuestros datos sugieren que el efecto atribuido a los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *ESR1*, *ESR2*, *SHBG* y *FcγR3A* en la modulación del riesgo a desarrollar erosiones óseas en pacientes con AR, podría ser dependiente de la presencia de polimorfismos en intrones o que codifiquen un cambio de aminoácido que afecten en mayor o menor medida a la respuesta inmunológica. Considerando la fortaleza de las asociaciones específicas de FR para variantes en los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *SHBG*, *ESR1*, *ESR2*, *FcγR3A* y *CYP3A4* en las poblaciones de REpAIR y de replicación, decidimos evaluar si estos SNPs podrían resultar de utilidad para predecir la aparición de erosiones óseas en pacientes seropositivos y seronegativos. Los resultados mostraron que la adición de 5 SNPs relacionados con la señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas dentro de los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *ESR2* y *SHBG* a un modelo con variables demográficas (edad y sexo) mejoraba de forma significativa la capacidad de predecir la aparición de erosiones óseas en pacientes seropositivos ($AUC_{\text{Modelo_Genético}}=0.73$ vs. $AUC_{\text{Modelo_Referencia}}=0.63$, $P=2.46 \cdot 10^{-8}$; Tabla 27), mientras que no tenía valor predictivo significativo en pacientes seronegativos ($AUC_{\text{Modelo_Genético}}=0.61$ vs. $AUC_{\text{Modelo_Referencia}}=0.59$, $P=0.36$; Figura 35). La consistencia de este análisis predictivo se confirmó mediante un test de permutaciones que demostró que ninguno de los 50.000 modelos permutados mejoraba la capacidad predictiva de nuestro modelo genético ($AUC_{\text{Promedio}}=0.644$, $Z_{\text{score}}=6.79$ y $P_{Z_{\text{score}}(50.000\text{perm})}=5.67 \cdot 10^{-12}$). Aunque la ausencia de pacientes portadores del genotipo *CYP2C9*_{rs1799853T/T} y el escaso tamaño de la población de replicación limitaba la oportunidad de validar el modelo genético para predecir la enfermedad erosiva, intentamos confirmar la utilidad de este modelo predictivo en la población del registro DREAM. Encontramos que un modelo similar mejoraba ligeramente la capacidad de predecir la enfermedad erosiva en pacientes seropositivos y seronegativos ($AUC_{\text{Modelo_Genético-FR+}}=0.63$ vs. $AUC_{\text{Modelo_Referencia-FR+}}=0.53$, $P=0.014$ y $AUC_{\text{Modelo_Genético-FR-}}=0.78$ vs. $AUC_{\text{Modelo_Referencia-FR-}}=0.54$, $P=0.015$; Figura 35). Sin embargo, a pesar de estos resultados interesantes, solo las variantes *CYP1B1* y *CYP2C9* parecían tener un valor predictivo consistente para el desarrollo de erosiones óseas en pacientes seropositivos.

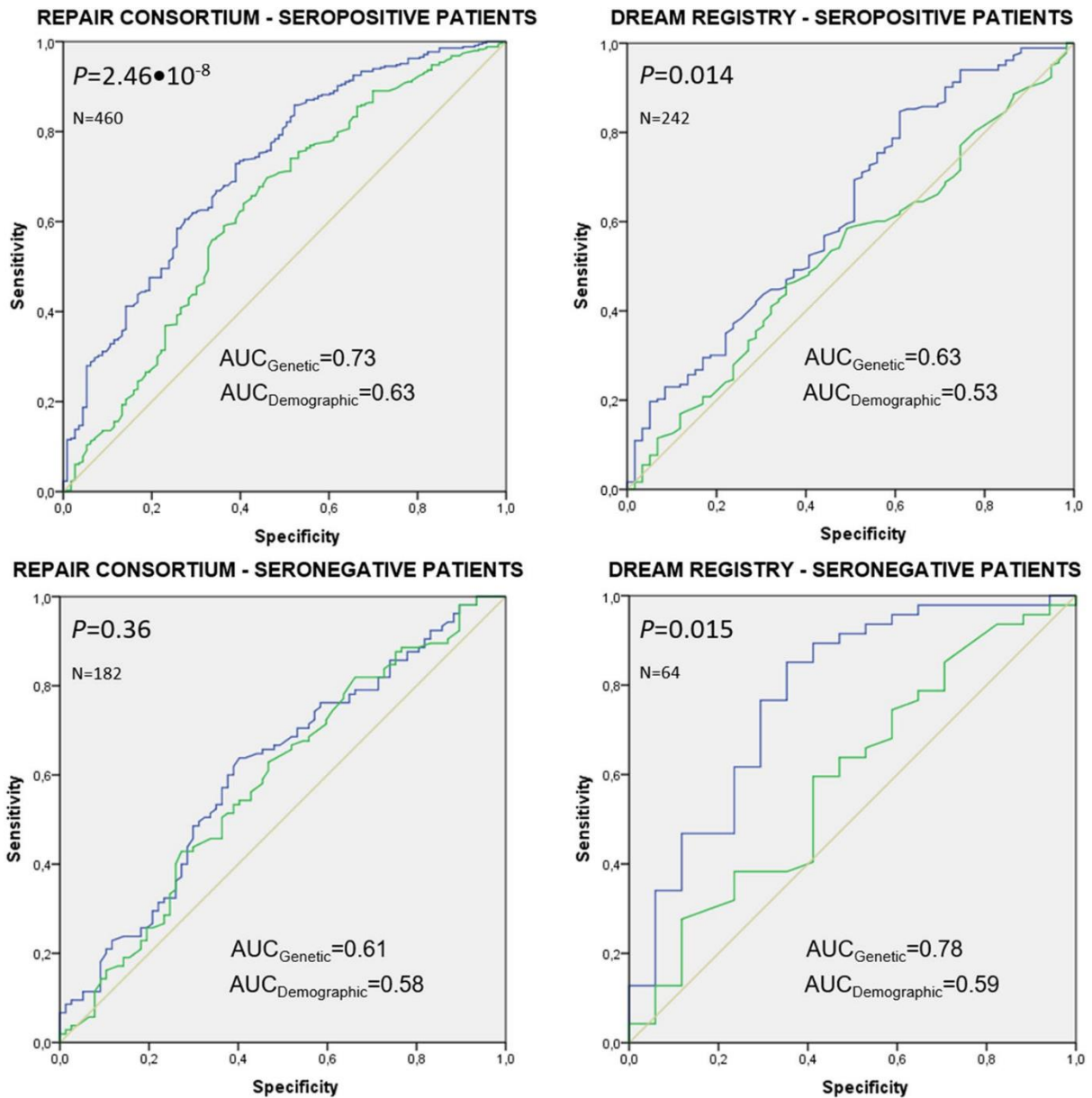
Tabla 27. Modelo predictivo que incluye los SNPs relacionados con las hormonas esteroideas en las poblaciones

| Población REPAIR (n=816; FR⁺=571 y FR⁻=238) | | | | Población de Replicación (Registro DR) | | | |
|--|----------------|----------------------------|----------------------|--|---------|---------------------|-------------|
| Modelo de Referencia (Pacientes FR ⁺ ; n=460) | | | Prueba LR P | Modelo de Referencia (Pacientes FR ⁺ ; n=460) | | | Prueba LR P |
| | P-valor | OR 95% CI | | | P-valor | OR 95% CI | |
| Género (hombre) | 0.004 | 0.486 (0.296-0.798) | | Género (hombre) | 0.740 | 1.113 (0.590-2.100) | |
| Edad | 0.00066 | 1.030 (1.013-1.048) | 0.629 (0.567-0.692) | Edad | 0.654 | 0.995 (0.972-1.018) | |
| Modelo Genético incluyendo 5 SNPs (Pacientes FR ⁺ ; n=460)* | | | Prueba LR P | Modelo Genético incluyendo 5 SNPs (Pacientes FR ⁺ ; n=460)* | | | Prueba LR P |
| | P-valor | OR 95% CI | | | P-valor | OR 95% CI | |
| ESR2 _{rs1271572} | 0.002 | 0.414 (0.236-0.726) | 0.730 (0.672-0.780)‡ | ESR2 _{rs1271572} | 0.763 | 0.899 (0.450-1.796) | |
| CYP2C9 _{rs1799853} | 0.024 | 0.226 (0.062-0.824) | | CYP2C9 _{rs1799853} | 0.058 | 3.385 (0.96-11.94) | |
| CYP1B1 _{rs10012} | 0.013 | 0.442 (0.233-0.840) | | CYP1B1 _{rs10012} | 0.014 | 0.285 (0.105-0.772) | |
| CYP3A4 _{rs2740574} | 0.005 | 5.793 (1.718-19.53) | | CYP3A4 _{rs2740574} | 0.075 | 0.370 (0.124-1.107) | |
| SHBG _{rs6259} | 0.011 | 2.316 (1.212-4.425) | | SHBG _{rs6259} | 0.444 | 1.378 (0.606-3.130) | |
| Género (hombre) | 0.005 | 0.475 (0.281-0.803) | | Género (hombre) | 0.941 | 0.976 (0.505-1.884) | |
| Edad | 0.00039 | 1.033 (1.015-1.052) | | Edad | 0.811 | 0.997 (0.972-1.022) | |
| Modelo de Referencia (Pacientes FR ⁻ ; n=182) | | | Prueba LR P | Modelo de Referencia (Pacientes FR ⁻ ; n=182) | | | Prueba LR P |
| | P-valor | OR 95% CI | | | P-valor | OR 95% CI | |
| Género (hombre) | 0.713 | 0.864 (0.397-1.882) | | Género (hombre) | 0.322 | 0.542 (0.161-1.820) | |
| Edad | 0.053 | 0.978 (0.956-1.000) | 0.588 (0.503-0.672) | Edad | 0.511 | 1.014 (0.973-1.056) | |
| Modelo genético incluyendo 5 SNPs (Pacientes FR ⁻ ; n=182) | | | Prueba LR P | Modelo genético incluyendo 5 SNPs (Pacientes FR ⁻ ; n=182) | | | Prueba LR P |
| | P-valor | OR IC95% | | | P-valor | OR 95% CI | |
| ESR2 _{rs1271572} | 0.804 | 1.103 (0.509-2.388) | 0.613 (0.530-0.696) | ESR2 _{rs1271572} | 0.828 | 1.214 (0.212-6.937) | |
| CYP2C9 _{rs1799853} | 0.105 | 6.052 (0.688-53.26) | | CYP2C9 _{rs1799853} | 0.219 | 0.287 (0.039-2.097) | |
| CYP1B1 _{rs10012} | 0.521 | 1.526 (0.420-5.549) | | CYP1B1 _{rs10012} | 0.493 | 2.316 (0.209-25.60) | |
| CYP3A4 _{rs2740574} | 0.422 | 0.668 (0.250-1.785) | | CYP3A4 _{rs2740574} | 0.033 | 0.113 (0.015-0.836) | |
| SHBG _{rs6259} | 0.699 | 0.870 (0.43-1.760) | | SHBG _{rs6259} | 0.029 | 0.139 (0.024-0.814) | |
| Género (hombre) | 0.394 | 0.696 (0.303-1.600) | | Género (hombre) | 0.287 | 0.453 (0.106-1.943) | |
| Edad | 0.065 | 0.979 (0.956-1.001) | | Edad | 0.949 | 0.998 (0.950-1.049) | |

^a El modelo de referencia incluía edad, y sexo como variables demográficas que nunca se eliminaban del modelo y fue comparado

* Todos los SNPs que mostraron una asociación significativa con la presencia de erosiones fueron incluidos en el modelo ($P < 0.10$) construido en la población REPAIR. ‡ El análisis de la población REPAIR reveló que el modelo genético mostraba una AUC sistemáticamente más alta que la observada para los 50.000 modelos permutados. El valor medio de AUC (50.000 modelos) = 0.644, Z score = 6.79, $P_{Z_score_value_50.000perm} = 5.67 \cdot 10^{-12}$. † Todos los SNPs fueron forzados para su inclusión en el modelo de la población de replicación con la excepción de la variante *CYP2C9_{rs1057910}* que fue incluida debido a la imposibilidad de calcular los valores de asociación para el SNP *CYP2C9_{rs1799853}*.

Figura 35. Análisis de curva ROC en las poblaciones de REPAIR y el registro DREAM.



Las curvas ROC resumen la precisión de la predicción para modelos genéticos y demográficos en pacientes seropositivos y negativos. El modelo genético (marcado en AZUL) incluyó los SNPs que presentaron una asociación significativa con la aparición de erosiones óseas en pacientes seropositivos (en el análisis individual de SNPs o en el de haplotipos), mientras que el modelo demográfico incluyó variables demográficas (edad y sexo; marcado en VERDE) que nunca se sacaban del modelo.

6. Discusión.

En este estudio describimos por primera vez la asociación global o dependiente de FR de polimorfismos en genes implicados en la señalización, transporte y metabolismo de hormonas esteroideas con el riesgo a desarrollar enfermedad erosiva durante el curso de la enfermedad reumatoidea. Los resultados más relevantes se encontraron para los SNPs en los genes *CYP1B1*, *CYP2C9* y *ESR2*. Observamos que los pacientes con AR seropositivos y que portaban los genotipos *CYP1B1*_{rs10012G/G}, *CYP2C9*_{rs1799853T/T}, and *ESR2*_{rs1271572T/T} tenían un riesgo significativamente menor de desarrollar erosiones óseas durante el curso de la enfermedad, mientras que se observaba un efecto opuesto y no significativo en los pacientes seronegativos. Aunque el pequeño tamaño de la población analizada dificultó considerablemente la validación de las asociaciones observadas para el modelo recesivo, pudimos validar la asociación dependiente del FR del polimorfismo *CYP1B1*_{rs10012} con el riesgo a desarrollar erosiones óseas en la población de replicación y en el meta-análisis de las poblaciones de REPAIR y DREAM confirmó el fuerte efecto modificador del FR sobre la asociación de este SNP con el riesgo de enfermedad erosiva. Además, aunque no pudimos validar el efecto dependiente del FR sobre la enfermedad erosiva de la variante *CYP2C9*_{rs1799853} en la población de replicación debido a la falta de pacientes portadores del genotipo *CYP2C9*_{rs1799853T/T}, pudimos detectar un efecto dependiente del FR para un SNP vecino en el gen *CYP2C9* (rs10579210) que, además, fue confirmado a través del meta-análisis de las dos poblaciones de estudio. Aunque este SNP no estaba en desequilibrio de ligamiento con el rs1799853 y, por tanto, no presentaba la misma señal de asociación, estos resultados apoyaban la idea de que el locus *CYP2C9* podría influir en el riesgo a desarrollar erosiones óseas en pacientes con AR y que dicho efecto era dependiente de la presencia de FR. Aunque la conexión biológica entre el *CYP2C9* y la aparición de erosiones es aún desconocida, es plausible pensar que este gen pueda estar modulando el metabolismo de las hormonas y que, de esa manera, pueda regular la respuesta inmunitaria mediada por hormonas.

Mientras que el gen *CYP1B1* está localizado en el cromosoma 2q21-22, el *CYP2C9* pertenece a la familia *CYP2C*, un grupo de genes (*CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8*) localizados en el cromosoma 10q23.3. Junto con *CYP1A2* y *CYP3A4*, *CYP1B1* y *CYP2C9* catalizan la conversión de los estrógenos a catecol-estrógenos [487] que es un proceso clave que permite su unión a los receptores ESR1 y ESR2. A bajas concentraciones, *CYP2C9* está también implicado en la deshidrogenación del grupo 17-beta-hidroxilo del estradiol lo que lo transforma en estrona, una hormona que es una de las tres formas de estrógenos que nos podemos encontrar en la naturaleza y que tiene múltiple funciones inmunomoduladores. Dado que ambas variantes *CYP2C9*_{rs1799853} y *CYP2C9*_{rs1799853} alteran la secuencia aminoacídica de la proteína (R48G y Arg144Cys) y parecen producir una disminución en la actividad de la enzima y afectan al plegamiento y estabilidad de la proteína, creemos que la presencia estos polimorfismos podría

determinar respuesta inmunitaria dependiente de estrógenos y, por tanto, modular el riesgo a desarrollar erosiones óseas. Los estudios funcionales desarrollados además demuestran que la variante *CYP2C9*_{rs1799853} correlacionaba con los niveles de vitamina D3, lo que sugería que este polimorfismo podría también afectar a la progresión de la enfermedad mediante la regulación de la respuesta inmunitaria mediada por vitamina D3. Sin embargo, debemos interpretar estos resultados con precaución ya que solo encontramos una correlación significativa del marcador con los niveles de vitamina D3 en mujeres. Estos resultados, junto con aquellos datos que mostraron que los portadores del alelo *CYP2C9*_{rs1799853T} tenían una mayor producción de IL1 β tras la estimulación de PBMCs o sangre completa con LPS o PHA, sugerían que el efecto protector atribuido a esta variante podría no solo depender de la vitamina D3 sino, además, de otros factores como el FR entre otros posibles estímulos o sustratos. A este respecto, nuestro grupo ya demostró que el polimorfismo *CYP2C9*_{rs1799853} estaba fuertemente asociado con una pobre respuesta a fármacos anti-TNF en AR [181], lo que podría sugerir que esta variante no sinónima podría modular la respuesta inmunitaria a través de la regulación del metabolismo de compuestos endógenos, pero también compuestos administrados exógenamente.

Aunque intentamos además validar la asociación dependiente del FR para el genotipo *ESR2*_{rs1271572T/T} con un menor riesgo de desarrollar erosiones óseas en la población de replicación, solo pudimos encontrar un efecto modesto y no significativo de esta variante sobre la enfermedad erosiva. Sin embargo, la dirección del efecto en pacientes seropositivos y seronegativos fue similar a la observada en la población REpAIR y el meta-análisis de ambas cohortes confirmó que el efecto de este SNP sobre el riesgo de desarrollar erosiones óseas era dependiente de la presencia del FR. En línea con la hipótesis que sugería un efecto dependiente de FR para los marcadores en *ESR2*, observamos que los pacientes seropositivos que portaban el haplotipo *ESR2*_{CGTA} tenían un menor riesgo a desarrollar erosiones óseas, mientras que no se observaba efecto alguno en los pacientes seronegativos. Por otra parte, resultó interesante observar la asociación de 3 haplotipos en *ESR1* (*ESR1*_{CTATTTCTA}, *ESR1*_{CTATTCCTCA} y *ESR1*_{GTATTCCTA}) que asociaban con un menor riesgo a desarrollar erosiones óseas, lo que sugería un papel de los SNPs de este gen en la modulación del riesgo a desarrollar erosiones.

Los genes *ESR2* y *ESR1* (situados respectivamente en los cromosomas 14q23.2 y 6q25.1) codifican para los receptores de estrógenos beta (*ESR* β) y alfa (*ESR* α) que están altamente expresados en células sinoviales [475] y el hueso [476], pero además en la mayoría de las células inmunitarias [477]. Aunque varios estudios experimentales han demostrado que las mujeres con AR tienen peor pronóstico, mayor actividad inflamatoria durante la enfermedad y peor puntuación en los cuestionarios de evaluación de la salud en comparación con pacientes masculinos, se ha demostrado que las hormonas esteroideas pueden tener tanto un papel inflamatorio como

antiinflamatorio en la AR. Si bien se ha descrito, por ejemplo, que la activación de ESR por estradiol conduce a la protección de las articulaciones y al mantenimiento de la densidad ósea (al inhibir la resorción ósea) [478] y que la retirada de estrógenos aumenta drásticamente la gravedad de la enfermedad (al promover la destrucción articular, la erosión ósea y la discapacidad física) [480], también se ha visto que los pacientes con AR tienen niveles más altos de estrona en el líquido sinovial en comparación con individuos sanos. Por otra parte, se ha descrito que los estrógenos pueden inducir respuestas proinflamatorias a través de la activación de diferentes mecanismos que implican la respuesta inmunitaria humoral [370], ciertos factores de transcripción (c/EBP β , STAT-1, NF κ B) y vías de estrés oxidativo (especialmente aquellas que involucran la NOS inducible) [494, 495]. Además, se ha observado que los estrógenos pueden promover la proliferación de células B y T [483], la maduración de timocitos [481], el tráfico celular [482] y la expresión de ciertas moléculas de adhesión [483]. Aunque la paradoja existente con respecto al papel inmunomodulador de las hormonas esteroideas en la AR sigue sin resolverse, parece razonable plantear la hipótesis de que la presencia de polimorfismos de *ESR2* que se correlacionan con los niveles de expresión de ARNm del gen *ESR2* puedan influir sobre el riesgo a desarrollar erosiones óseas, probablemente a través de la modulación de la respuesta inmunitaria tolerogénica dependiente de *ESR2*. Asimismo, aunque la correlación de los SNPs en los genes *ESR2* y *ESR1* con los niveles hormonales en suero o con los niveles de TNF α e IL6 en macrófagos estimulados no era significativa tras la corrección por múltiples comparaciones, nuestros hallazgos funcionales estuvieron en línea con los resultados genéticos que sugerían un efecto protector de los polimorfismos en *ESR2* y los haplotipos en *ESR1* sobre el riesgo a desarrollar una enfermedad erosiva. Asimismo, nuestros resultados genéticos y funcionales coincidieron con los datos de estudios previos que sugirieron que la presencia de ciertos SNPs, microsatélites o incluso haplotipos en genes de receptores de estrógenos determina la densidad mineral del hueso e influye en el riesgo a desarrollar erosiones óseas [496, 497] en pacientes con AR [498], pero también en pacientes diagnosticados con otras enfermedades inflamatorias crónicas [499] o enfermedades óseas degenerativas [500, 501].

Finalmente, este estudio también demostró un débil, pero interesante efecto dependiente del FR para los SNPs *SHBG*_{rs6259} y *Fc γ R3A*_{rs396991} sobre el riesgo a tener erosiones. En línea con lo observado en la población de REpAIR, en la población de replicación pudimos validar el efecto dependiente del FR para ambas variantes y el meta-análisis de ambas cohortes confirmó que el efecto de estos SNPs sobre el riesgo a desarrollar erosiones óseas estaba mediado específicamente por el FR.

Aunque se conoce poco sobre el papel del locus *SHBG* (17p13) en la determinación de la progresión de la AR, una serie de estudios experimentales han demostrado que el locus *Fc γ R3A* (1q23) está involucrado en el reconocimiento de IgG1 e IgG3 por células NK y macrófagos, que están implicados en la activación de este receptor por ICs de IgG

e IgG-FR que podría conducir a la iniciación de una serie de eventos inflamatorios dañinos que, si se cronifican, pueden causar destrucción de las articulaciones y el hueso promoviendo la aparición de AR [502-504]. En este contexto y considerando el número de estudios que han relacionado el SNP *FcγR3A*_{rs396991} con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias [505-512], con la respuesta a una amplia variedad de terapias biológicas [513-519] y una producción exacerbada de TNF α después de la estimulación de macrófagos con LPS durante 24 horas, pero además la asociación de la variante *SHBG*_{rs6259} con los niveles séricos de SHBG [520], hipotetizamos que estos SNPs también podrían desempeñar un papel relevante en la determinación de la erosión ósea y la progresión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta el notable impacto dependiente del FR para los SNPs *CYP1B1*, *CYP2C9*, *ESR2*, *FcγR3A* y *SHBG* sobre el riesgo de desarrollar enfermedad erosiva, pero además su implicación funcional en la modulación de los niveles hormonales y/o la respuesta inmunitaria, decidimos además evaluar si la presencia de variantes relacionadas con la señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas podría ser útil para predecir con fiabilidad la aparición de erosiones óseas en pacientes seropositivos y seronegativos por separado. Para hacer eso, creamos un modelo genético que incluían variables demográficas y aquellos SNPs que se asociaban significativamente con el riesgo de desarrollar erosiones óseas en pacientes seropositivos. Tras eliminar aquellos SNPs que no estaban asociados con erosiones en el modelo, obtuvimos un modelo final formado por 5 SNPs en los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *ESR2* y *SHBG* que mejoraba significativamente la capacidad de predecir el riesgo de desarrollar enfermedad erosiva en comparación con el modelo de referencia. La capacidad predictiva de estos SNPs se limitó a pacientes seropositivos ya que la adición de las mismas variantes (o cualquier otro marcador genético) a un modelo con variables demográficas no ofrecía ningún resultado significativo en pacientes seronegativos. La capacidad predictiva del modelo genético en pacientes seropositivos fue consistente ya que no se encontraron modelos similares después de realizar la prueba de las 50.000 permutaciones. Cuando intentamos confirmar la utilidad de este modelo en la población de replicación del registro DREAM, encontramos que los SNPs *CYP1B1* y *CYP2C9* tenían un valor predictivo consistente con el desarrollo de erosiones óseas en pacientes seropositivos. Estos resultados sugieren que los polimorfismos *CYP1B1* y *CYP2C9* solos o en combinación con otros marcadores clínicos y genéticos podrían ayudar a mejorar la capacidad de predecir la aparición de erosiones en pacientes seropositivos (~70% de los pacientes con AR). Estudios adicionales incluyendo estos y otros marcadores genéticos y clínicos son necesarios en la actualidad para poder predecir la aparición de erosiones óseas en la AR.

Este estudio tiene fortalezas y debilidades. Los puntos fuertes de este estudio incluyen una población relativamente grande y bien caracterizada y el meta-análisis considerando los resultados de las poblaciones de REpAIR y el registro DREAM. En la

población REpAIR, teníamos un 80% de poder estadístico para detectar una OR de 1.68 ($\alpha=0.00074$) para un SNP con una frecuencia del alelo menor de 0.25, lo que demostraba la fiabilidad del diseño del estudio. Otra fortaleza importante de este estudio consistió en el desarrollo de experimentos de estimulación de citoquinas y la determinación de siete hormonas esteroideas en suero en una gran cohorte de donantes sanos que nos permitió investigar el papel funcional de los marcadores más interesantes en la modulación de la respuesta inmunitaria y los niveles de hormonas esteroideas. Un inconveniente de este estudio fue su naturaleza multicéntrica que impuso algunas limitaciones inevitables como la imposibilidad de definir con más exactitud las erosiones óseas a través del uso de las escalas de Sharp van der Heijde, Genant, SENSE y Ratingen). Dado el enfoque traslacional del estudio, también tuvimos algunas limitaciones intrínsecas como la existencia de un posible sesgo debido a variaciones en los tratamientos y el tiempo de seguimiento entre los participantes del estudio. Finalmente, es importante mencionar que la selección de SNPs para este estudio estuvo influenciada por los fondos de investigación que era limitados y por el tamaño relativamente pequeño de la población de replicación que dificultó la validación de las asociaciones cuando se asumía un modelo de herencia recesivo.

Determinar el impacto de variantes genéticas en la vía de señalización de NFκB sobre el riesgo a desarrollar AR y la modulación de la respuesta a terapias biológicas con fármacos anti-TNF.

ARTÍCULO Nº 3. NFκB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium.

José Manuel Sánchez-Maldonado, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhão, Rob ter Horst, Sonia Muñoz-Peña, Ana Moñiz-Díez, Ana Rodríguez-Ramos, Alejandro Escudero, Signe B. Sorensen, Merete L. Hetland, Miguel A. Ferrer, Bente Grintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Antonio García, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Svend Erik Hove Jacobsen, Eduardo Collantes, Luca Quartuccio, Mihai G. Netea, Yang Li, João E. Fonseca, Manuel Jurado, Miguel Ángel López-Nevot, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, Rafael Cáliz, & Juan Sainz. **Scientific Report. March 2020.** <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61331-5>.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC
REPORTS
nature research

OPEN

NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium

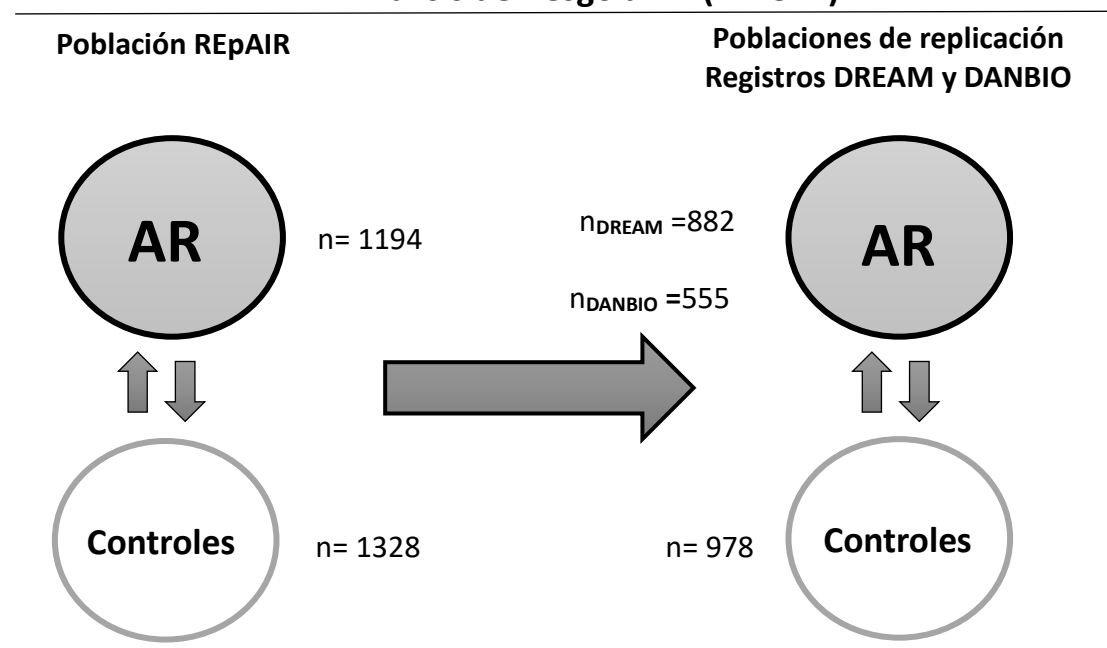
Jose Manuel Sánchez-Maldonado^{1,2}, Manuel Martínez-Bueno³, Helena Canhão⁴, Rob ter Horst⁵, Sonia Muñoz-Peña¹, Ana Moñiz-Díez¹, Ana Rodríguez-Ramos⁶, Alejandro Escudero⁸, Signe B. Sorensen^{9,10}, Merete L. Hetland^{11,12}, Miguel A. Ferrer¹³, Bente Grintborg^{11,12}, Ileana Filipescu¹⁴, Eva Pérez-Pampin¹⁵, Pablo Conesa-Zamora¹⁶, Antonio García¹³, Alfons den Broeder¹⁷, Salvatore De Vita¹⁸, Svend Erik Hove Jacobsen¹⁹, Eduardo Collantes⁸, Luca Quartuccio¹⁸, Mihai G. Netea^{5,6}, Yang Li^{5,7}, João E. Fonseca^{20,21}, Manuel Jurado^{1,2}, Miguel Ángel López-Nevot^{2,22}, Marieke J. H. Coenen¹⁷, Vibeke Andersen^{9,10}, Rafael Cáliz^{1,2,13} & Juan Sainz^{1,2*}

This study sought to evaluate the association of 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within NFKB and inflammasome pathway genes with the risk of rheumatoid arthritis (RA) and response to TNF inhibitors (TNFi). We conducted a case-control study in a European population of 1194 RA patients and 1328 healthy controls. The association of potentially interesting markers was validated with data from the DANBIO (695 RA patients and 978 healthy controls) and DREAM (882 RA patients) registries. The meta-analysis of our data with those from the DANBIO registry confirmed that anti-citrullinated protein

1. Características de la población de estudio.

Este estudio se desarrolló en la población REpAIR que en el momento del diseño del estudio estaba compuesta por 1194 casos de AR y 1328 controles sanos. La edad de los casos de AR era ligeramente más alta que la de los controles (59.22 ± 12.97 vs. 52.67 ± 8.99) y, como cabía esperar, la ratio mujeres/hombres era significativamente mayor en pacientes de AR que en los controles sanos (4.10 [959/234] vs. 1.39 [773/555]). El 60% de los pacientes con AR tenía valores positivos para anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) o FR, la media de duración de la enfermedad fue de 18 años y el DAS28 basal fue de 5.74 (Tabla 28).

Análisis de riesgo a AR (n=2522)



Análisis de respuesta a fármacos TNFi (n=2107)

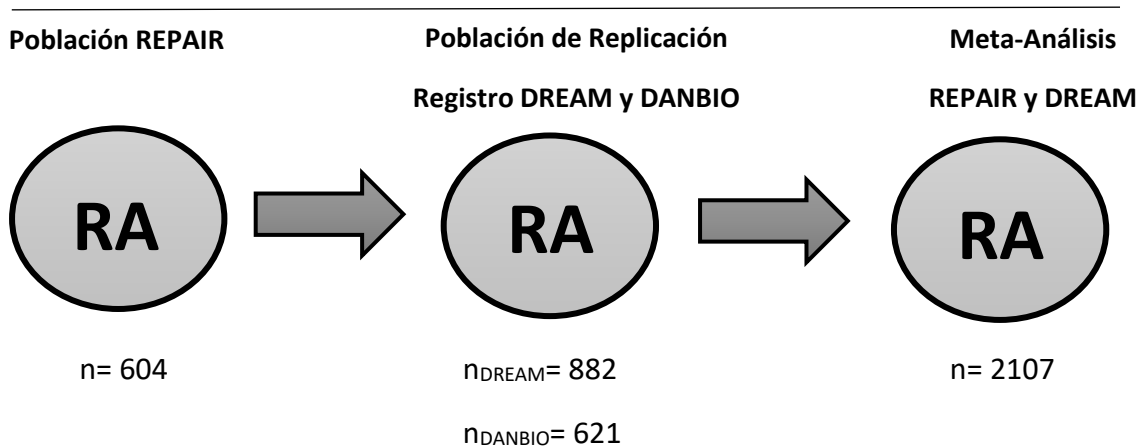


Tabla 28. Características demográficas y clínicas de los pacientes con AR.

| Características demográficas | Población REpAIR (n=1194) | Registro DREAM [†] (n=882) | Registro DANBIO (n=695) |
|-------------------------------------|------------------------------|--|----------------------------|
| Edad (años) | 59.22±12.97 | 54.63±12.80 | 54.27±13.30 |
| Ratio del Género (mujer/hombre) | 4.01 (959/234) | 2.07 (478/230) | 2.80 (512/183) |
| Evaluación Clínica | | | |
| Pacientes FR-positivo* | 764 (68.64) | 534 (77.62) | 221 (64.06) |
| Pacientes Anti-CCP-positivo* | 643 (70.74) | 151 (62.14) | 390 (72.90) |
| DAS28 en estado basal | 5.74±2.15 | 5.33±1.26 | 4.77±1.23 |
| Duración de la enfermedad (años) | 17.60±9.99 | 9.70±9.57 | 7.89±8.86 |
| Tratamientos | | | |
| DMARDs en primera línea | | | |
| Metotrexato (%) | 798 (66.83) | 463 (65.40) | 514 (73.95) |
| Leflunomida (%) | 324 (27.14) | ND | ND |
| Sulfasalacina (%) | 149 (12.48) | ND | ND |
| Primera Agente Biológico | | | |
| Infliximab (%) | 386 (32.33) | 244 (34.46) | 159 (22.88) |
| Etanercept (%) | 227 (19.01) | 130 (18.36) | 200 (28.78) |
| Adalimumab (%) | 191 (16.00) | 334 (47.18) | 173 (24.89) |
| Golimumab (%) | 17 (01.42) | — | 47 (06.76) |
| Certolizumb (%) | — | — | 72 (10.36) |
| Rituximab (%) | 13 (01.09) | — | 16 (02.30) |
| Tocilizumab (%) | 6 (00.50) | — | 19 (02.73) |
| Anakinra (%) | — | — | 2 (00.29) |
| Otros (%) | 14 (01.17) | — | 7 (01.01) |

Los datos son la media ± SD o n (%). Abreviaturas: anti-CCP (Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados), DAS28 (Índice de la actividad de la enfermedad), DMARDs (medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), ND (datos no determinados o desconocidos) y FR (factor reumatoide). †Datos Clínicos para 708 pacientes con AR, de los cuales tenemos ADN para genotiparlos, *FR estuvo disponible en 1113, 688 y 345 pacientes en las poblaciones de REpAIR, DREAM y DANBIO, respectivamente. *Los anti-CCP se analizaron en 908, 127 y 535 pacientes de las poblaciones REpAIR, DREAM y DANBIO, respesivamente.

2. Análisis de asociación de las variantes de la vía NFκB y el riesgo a AR.

En este estudio se seleccionaron 28 SNPs en genes relevantes de la vía del NFκB (Tabla 29).

Tabla 29. Variantes genéticas seleccionada en la ruta de señalización de NFκB.

| Genes | Cr | dbSNP rs# | Localización | Información asociada con enfermedades autoinmunitarias, Respuesta potencial |
|----------------------|----|--------------|-------------------------|---|
| <i>GBP6</i> | 1 | rs928655_A | Intrónica | Associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis [521] |
| <i>KBKB</i> | 8 | rs11986055_A | Intrónica | |
| <i>IRF4</i> | 6 | rs1050975_A | 3'-UTR/ncRNA | |
| <i>IRF4</i> | 6 | rs12203592_T | Intrónica | Correlated with white blood cell count [522] |
| <i>IRF4</i> | 6 | rs1877175_T | 3'-UTR/ncRNA | |
| <i>IRF4</i> | 6 | rs7768807_T | 3'-UTR/ncRNA | |
| <i>KLRC1</i> | 12 | rs7301582_T | Intrónica | Associated with response to anti-TNF therapy in RA patients [523] |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | 12 | rs1049174_C | 3'UTR/Intronic | Associated with response to anti-TNF therapy in RA patients [524] |
| <i>KLRC1 KLRC4</i> | 12 | rs1154831_A | Intrónica/cerca del gen | Lack of association with response to anti TNF therapy [524] |
| <i>KLRC1 KLRC4</i> | 12 | rs2255336_A | Tre72Ala | Correlation with blood NKG2D type II integral membrane protein levels [525] and associated with RA in RA patients [524]; Associated with a decreased risk of Lupus erythematosus [526, 527] |
| <i>LOC105376246</i> | 9 | rs2722824_A | cerca del gen | |
| <i>NFκB1</i> | 4 | rs4648110_A | Intrónica | |
| <i>NFκB2</i> | 10 | rs11574851_T | Asn698Asn | |
| <i>NFκB2</i> | 10 | rs12769316_T | cerca del gen | |
| <i>NFκB2 PSD</i> | 10 | rs1056890_T | cerca del gen/3'-UTR | |
| <i>NFκB1B</i> | 19 | rs3136645_C | ncRNA | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients [528] |
| <i>NLRP3</i> | 1 | rs4612666_T | Intrónica | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients [529] |
| <i>REL</i> | 2 | rs13031237_T | Intrónica | Overall association with the risk of RA at GWAS level [530],[197, 286] Association with RA [531] and autoimmune diseases [532] in large case-control studies |
| <i>REL</i> | 2 | rs842647_A | Intrónica | Associated with susceptibility to Behcet's disease [533] |
| <i>REL</i> | 2 | rs13017599_A | cerca del gen | Associated with RA and psoriatic arthritis at GWAS level [530], [534] and in a candidate gene study [535] |
| <i>RELA</i> | 11 | rs11820062_T | Intrónica | Eosinophil counts [522]. |
| <i>RELA</i> | 11 | rs2306365_A | Intrónica | |
| <i>RELA</i> | 11 | rs7119750_T | Intrónica | |
| <i>TLR10</i> | 4 | rs11096957_A | Asn241His | Associated with hip osteoarthritis [536, 537] and effectiveness of biologics for psoriasis treatment [538] |
| <i>TLR4</i> | 9 | rs498679_T1 | Tr399Ile | TLR4: lymphocyte 96 antigen complex level [525]; Associated with RA risk and response to anti-TNF therapy [539]; Associated with developing inflammatory bowel disease [540] |
| <i>TLR5</i> | 1 | rs7544174_C | Phe616Leu | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients [541]; Associated with the risk of RA [542]; Associated with response to ustekinumab treatment in psoriasis patients [543] |
| <i>TLR9 TWF2</i> | 3 | rs187084_T | cerca del gen | Associated with psoriatic arthritis risk [544], hip and knee osteoarthritis [545, 546], SLE [547], and autoimmune thyroid disease [549]; response to anti-TNF therapy in patients with RA [548] |
| <i>TRAF1 C5</i> | 9 | rs3761847_A | cerca del gen | Associated with RA at GWAS level [197, 550]. |

Abreviaturas: ncRN; Ácidos Ribonucleicos no codificantes, UTR; Región no Traducida. El alelo de riesgo fue seleccionado por datos de GWAS.

El análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo y país de origen mostró que los pacientes que portaban el alelo *NLRP3*_{rs4612666T} o el genotipo *IRF4*_{rs1050975A/A} y *NFκB2*_{rs12769316T/T} tenían un mayor riesgo de desarrollar AR a un nivel de significación de $P \leq 0.05$ ($OR_{Dom} = 1.25$, 95% CI 1.05–1.49, $P = 0.013$; $OR_{Rec} = 1.30$, 95% CI 1.04–1.62, $P = 0.019$; y $OR_{Rec} = 1.70$, 95% CI 1.04–2.78, $P = 0.034$; Tabla 29). El análisis estratificado por anti-CCP además reveló que los pacientes anti-CCP positivos que portaban el genotipo *NFκB1*_{rs4648110A/A} o el alelo *NFκB2*_{rs11574851T} tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR mientras que no se detectó efecto alguno en los pacientes con valores de anti-CCP negativos ($OR_{Rec-anti-CCP+} = 1.65$, 95% CI 1.04–2.63, $P = 0.031$ vs. $OR_{Rec-anti-CCP-} = 0.86$, 95% CI 0.39–1.90, $P = 0.90$ y $OR_{Alélica_anti-CCP+} = 1.39$, 95% CI 1.06–1.83, $P = 0.017$ y $OR_{Alélica_anti-CCP-} = 1.02$, 95% CI 0.68–1.52, $P = 0.93$; Tabla 30). Por otro lado, encontramos que los sujetos seronegativos que portaban los alelos *KLRC*_{rs7301582T} o *KLK1*_{rs1049174C} mostraron un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR, mientras que no se detectó ningún efecto en pacientes con valores positivos de anti-CCP ($OR_{Dom-anti-CCP-} = 1.56$, 95% CI 1.18–2.09, $P = 0.003$ vs. $OR_{Dom-anti-CCP+} = 1.05$, 95% CI 0.84–1.30, $P = 0.67$ y $OR_{Dom-anti-CCP-} = 1.38$, 95% CI 1.03–1.84, $P = 0.031$ vs. $OR_{Dom-anti-CCP+} = 1.09$, 95% CI 0.88–1.35, $P = 0.42$).

Aunque ninguna de las asociaciones mencionadas con anterioridad sobrevivió la corrección por comparaciones múltiples, decidimos intentar replicarlas a través de un meta-análisis de la población REPAIR y la población de replicación del registro DANBIO. El meta-análisis que incluyó 4.194 individuos (1.888 pacientes con AR y 2.306 controles sanos) confirmó que los pacientes portadores del genotipo *NFκB2*_{rs12769316T/T} tenían un mayor riesgo a desarrollar AR comparado con aquellos individuos que portaban el alelo C ($OR_{Meta} = 1.78$, 95% CI 1.21–2.63, $P = 0.0037$, $I^2 = 0.0\%$, $P_{Heterogeneidad} = 0.76$). Asimismo, aunque la asociación solo fue significativa a nivel nominal ($P < 0.05$), encontramos una asociación entre los pacientes que portaban el alelo *NFκB2*_{rs11574851T} con un mayor riesgo de desarrollar AR ($OR_{Meta} = 1.29$, 95% CI 1.02–1.64, $P = 0.035$, $P_{Heterogeneidad} = 0.27$). Dado que no se observó una estratificación significativa de la población, estos resultados sugerían que el efecto atribuido al locus *NFκB2* sobre el riesgo de desarrollar AR, posiblemente era real y probablemente podría deberse a la existencia a un haplotipo específico más que al efecto de los SNPs individuales. Siguiendo esta premisa, realizamos un análisis global de haplotipos que confirmó que los portadores del haplotipo *NFκB2*_{TC} (que incluía el alelo *NFκB2*_{rs11574851T}) tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar AR ($OR = 2.21$, 95% CI 1.37–3.56, $P = 0.0011$). A pesar de que esta asociación permanecía significativa tras la corrección de múltiples comparativas, estos resultados apuntaban a un papel de la variante *NFκB2*_{rs11574851} que contribuía a determinar el riesgo a desarrollar AR.

Tabla 30. Análisis de asociación global y estratificado por anti-CCP de los SNPs relacionados con la vía NFκB

| Genes | ID SNP | Cr. | Efecto alélico | AR Total (n=2521) | | AR pacientes anti-CCP ⁺ (n=1971) | | AR pacient |
|----------------------|------------|-----|----------------|-------------------------------|-------------|---|--------------|------------------|
| | | | | 1193 AR / 1328 Controles | P | 643 AR / 1328 Controles | P | 265 A |
| | | | | OR (95% CI) ^a | | OR (95% CI) ^a | | OR (95% |
| <i>GBP6</i> | rs928655 | 1 | A | 0.94 (0.81–1.08) | 0.37 | 0.88 (0.74–1.04) | 0.14 | 1.08 (0.8 |
| <i>IKBKB</i> | rs11986055 | 8 | A | 0.93 (0.71–1.21) | 0.59 | 1.15 (0.83–1.62) | 0.4 | 0.99 (0.6 |
| <i>IRF4</i> | rs1050975 | 6 | A | 1.30 (1.04–1.62)§ | 0.02 | 1.51 (1.14–1.99)§ | 0.003 | 1.30 (0.9 |
| <i>IRF4</i> | rs12203592 | 6 | T | 0.97 (0.81–1.18) | 0.79 | 0.99 (0.78–1.24) | 0.92 | 0.83 (0.6 |
| <i>IRF4</i> | rs1877175 | 6 | T | 1.00 (0.86–1.16) | 0.98 | 0.97 (0.80–1.16) | 0.7 | 1.04 (0.8 |
| <i>IRF4</i> | rs7768807 | 6 | T | 0.95 (0.83–1.10) | 0.51 | 0.93 (0.78–1.09) | 0.36 | 1.03 (0.8 |
| <i>KLRC1</i> | rs7301582 | 12 | T | 1.15 (1.00–1.34)† | 0.05 | 1.05 (0.84–1.30) [†] | 0.67 | 1.56 (1.1 |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs1049174 | 12 | C | 1.18 (0.99–1.41) [†] | 0.07 | 1.09 (0.88–1.35) [†] | 0.42 | 1.38 (1.0 |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs1154831 | 12 | A | 1.00 (0.86–1.16) | 0.99 | 1.05 (0.88–1.26) | 0.59 | 0.92 (0.7 |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs2255336 | 12 | A | 1.10 (0.94–1.27) | 0.22 | 1.04 (0.87–1.25) | 0.68 | 1.33 (0.9 |
| <i>LOC105376246</i> | rs2722824 | 9 | A | 0.96 (0.83–1.10) | 0.53 | 0.93 (0.79–1.10) | 0.41 | 1.08 (0.8 |
| <i>NFKB1</i> | rs4648110 | 4 | A | 1.28 (0.85–1.93)§ | 0.23 | 1.65 (1.04–2.63)§ | 0.03 | 0.86 (0.3 |
| <i>NFKB2</i> | rs11574851 | 10 | T | 1.17 (0.93–1.48) | 0.19 | 1.39 (1.06–1.83) | 0.02 | 1.02 (0.6 |
| <i>NFKB2</i> | rs12769316 | 10 | T | 1.70 (1.04–2.78)§ | 0.03 | 1.70 (0.95–3.06)§ | 0.08 | 2.53 (1.2 |
| <i>NFKB2 PSD</i> | rs1056890 | 10 | T | 0.96 (0.84–1.09) | 0.54 | 0.95 (0.81–1.12) | 0.56 | 1.01 (0.8 |
| <i>NFKBIB</i> | rs3136645 | 19 | C | 1.07 (0.91–1.24) | 0.42 | 1.15 (0.95–1.38) | 0.14 | 0.81 (0.6 |
| <i>NLRP3</i> | rs4612666 | 1 | T | 1.25 (1.05–1.49)† | 0.01 | 1.29 (1.04–1.60)† | 0.02 | 1.18 (0.8 |
| <i>REL</i> | rs13031237 | 2 | T | 1.16 (0.91–1.48) [†] | 0.24 | 1.15 (0.85–1.53)§ | 0.36 | 1.48 (1.0 |
| <i>REL</i> | rs842647 | 2 | A | 1.08 (0.94–1.24) | 0.3 | 1.10 (0.93–1.31) | 0.27 | 1.05 (0.8 |
| <i>REL</i> | rs13017599 | 2 | A | 1.06 (0.93–1.20) | 0.4 | 1.04 (0.89–1.21) | 0.64 | 1.17 (0.9 |
| <i>RELA</i> | rs11820062 | 11 | T | 0.93 (0.82–1.06) | 0.29 | 0.91 (0.78–1.05) | 0.2 | 1.07 (0.8 |
| <i>RELA</i> | rs2306365 | 11 | A | 1.07 (0.89–1.29) | 0.48 | 1.02 (0.81–1.28) | 0.86 | 1.16 (0.8 |
| <i>RELA</i> | rs7119750 | 11 | T | 1.09 (0.91–1.32) | 0.34 | 1.04 (0.82–1.30) | 0.76 | 1.24 (0.9 |
| <i>TLR10</i> | rs11096957 | 4 | A | 1.12 (0.99–1.27) | 0.07 | 1.13 (0.98–1.32) | 0.1 | 1.08 (0.8 |
| <i>TLR4</i> | rs4986791 | 9 | T | 1.17 (0.89–1.54) | 0.25 | 1.15 (0.83–1.60) | 0.4 | 1.00 (0.6 |
| <i>TLR5</i> | rs5744174 | 1 | C | 0.99 (0.87–1.13) | 0.86 | 1.03 (0.88–1.20) | 0.75 | 0.89 (0.7 |
| <i>TLR9 TWF2</i> | rs187084 | 3 | T | 0.97 (0.85–1.10) | 0.61 | 0.93 (0.80–1.09) | 0.39 | 1.02 (0.8 |
| <i>TRAF1 C5</i> | rs3761847 | 9 | A | 0.97 (0.85–1.10) | 0.61 | 1.00 (0.86–1.17) | 0.99 | 0.91 (0.7 |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de único nucleótido; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza. ^aAnálisis realizado según el modelo

sexo y país de origen. [†]Análisis realizado según el modelo de herencia dominante y ajustado por edad, sexo y país de origen. [§] Análisis realizado según el modelo de herencia recesivo y ajustado por edad, sexo y país de origen. $P \leq 0.05$. Los datos para anti-CCP se perdieron en 285 pacientes.

Por otra parte, el meta-análisis de los datos de asociación estratificados por anti-CCP mostró que cada copia del alelo $NF\kappa B2_{rs11574851T}$ confería un riesgo adicional del 48% a desarrollar AR en pacientes anti-CCP positivo ($OR_{Meta}=1.48$, 95% CI 1.18–1.86, $P=0.0006$), mientras que no tenía efecto en pacientes anti-CCP negativos (Tabla 30 y Figura 36). Además, es importante destacar que la asociación del SNP $NF\kappa B2_{rs11574851}$ con un mayor riesgo de AR se mantuvo significativa después de la corrección por comparaciones múltiples y se descartaba la heterogeneidad entre las poblaciones estudiadas ($P_{Heterogeneidad}=0.40$; Figura 36). El meta-análisis estratificado por anti-CCP de las poblaciones de estudio también mostró un mayor riesgo de desarrollar AR entre los individuos anti-CCP positivos y anti-CCP negativos que portaban el genotipo $NF\kappa B2_{rs12769316T/T}$ ($P=0.013$ y $P=0.004$; Tabla 31). Aunque ninguna de estas asociaciones permanecía significativa tras la corrección por comparaciones múltiples, estos hallazgos apoyaban el posible papel del locus $NF\kappa B2$ en la modulación del riesgo de desarrollar AR. Para confirmar nuestros datos, realizamos un análisis de haplotipos estratificado por anti-CCP que confirmó que los portadores del haplotipo $NF\kappa B2_{TT}$ (y que incluía el alelo de riesgo $NF\kappa B2_{rs11574851T}$) tenían un riesgo significativamente mayor a desarrollar AR ($OR_{Haplotipo-anti-CCP+}=1.39$, 95% CI 1.11–1.74, $P=0.0042$), mientras que no se encontró ningún efecto en individuos anti-CCP negativos ($OR_{Haplotipo-anti-CCP-}=1.04$, 95% CI 0.75–1.44, $P=0.82$; Tabla 32). Estos hallazgos apuntan nuevamente a que el gen $NF\kappa B2$ podría tener un efecto dependiente de la presencia de anti-CCP para modular el riesgo a desarrollar AR. No se observaron asociaciones adicionales en el meta-análisis de las cohortes de estudio.

Sobre la base del efecto encontrado para los SNPs $NF\kappa B2_{rs11574851}$ o $NF\kappa B2_{rs12769316}$ sobre el riesgo a desarrollar AR, decidimos analizar si estos SNPs podrían ejercer su función biológica directamente a través de la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por $NF\kappa B2$ o indirectamente a través de la regulación de los niveles de las hormonas esteroideas. Así pues, evaluamos si las variantes genéticas $NF\kappa B2_{rs11574851}$ y $NF\kappa B2_{rs12769316}$ correlacionaban con los niveles de 9 citocinas ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL1\beta$, $IL1RA$, $IL6$, $IL8$, $IL10$, $IL17$ e $IL22$) tras la estimulación de sangre completa, PBMCs o macrófagos con LPS, PHA o Pam3Cys en una cohorte de 408 donantes sanos. Aunque nuestros experimentos funcionales tenían un buen poder estadístico, no encontramos ninguna correlación significativa entre estos marcadores y las citocinas arriba anteriormente mencionadas o los niveles de las hormonas esteroideas. Aunque estos resultados podrían sugerir que la variante $NF\kappa B2$ no tiene impacto en la modulación de la respuesta inmunitaria, es importante recordar que el efecto de los SNPs en $NF\kappa B2$ podría depender de la presencia de anti-CCP como sugieren los datos genéticos.

Tabla 31. Meta-análisis para la asociación de los SNPs de la vía NFκB e inflammasoma y el riesgo a desarrollar

| Genes | ID SNP | Cr. | Efecto alélico | Población REPAIR (n=1971) | | Población de Replicación DANBIO (n=1741) | |
|---------------|------------|-----|----------------|---------------------------|--------------|--|--------------|
| | | | | OR (95% IC) ^a | P | OR (95% IC) ^a | P |
| GBP6 | rs928655 | 1 | A | 0.88 (0.74–1.04) | 0.14 | 1.24 (0.97–1.58) | 0.079 |
| IKKB | rs11986055 | 8 | A | 1.15 (0.83–1.62) | 0.4 | — | — |
| IRF4 | rs1050975 | 6 | A | 1.51 (1.14–1.99)§ | 0.003 | 0.93 (0.65–1.32)§ | 0.68 |
| IRF4 | rs12203592 | 6 | T | 0.99 (0.78–1.24) | 0.92 | — | — |
| IRF4 | rs1877175 | 6 | T | 0.86 (0.75–1.01) | 0.065 | 1.06 (0.84–1.33) | 0.61 |
| IRF4 | rs7768807 | 6 | T | 0.93 (0.78–1.09) | 0.36 | — | — |
| KLRC1 | rs7301582 | 12 | T | 1.15 (0.97–1.37) | 0.096 | 0.85 (0.67–1.08) | 0.19 |
| KLRK1 KLRC4 | rs1049174 | 12 | C | 1.06 (0.90–1.25) | 0.45 | 0.95 (0.76–1.19) | 0.66 |
| KLRK1 KLRC4 | rs1154831 | 12 | A | 1.05 (0.88–1.26) | 0.59 | — | — |
| KLRK1 KLRC4 | rs2255336 | 12 | A | 1.04 (0.87–1.25) | 0.68 | — | — |
| LOC105376246 | rs2722824 | 9 | A | 0.93 (0.79–1.10) | 0.41 | — | — |
| NFκB1 | rs4648110 | 4 | A | 1.16 (0.97–1.39) | 0.11 | — | — |
| NFκB2 | rs11574851 | 10 | T | 1.39 (1.06–1.83) | 0.017 | 1.72 (1.14–2.59) | 0.009 |
| NFκB2 | rs12769316 | 10 | T | 1.70 (0.95–3.06)§ | 0.077 | 1.91 (0.93–3.92)§ | 0.08 |
| NFκB2 PSD | rs1056890 | 10 | T | 0.95 (0.81–1.12) | 0.56 | — | — |
| NFκBIB | rs3136645 | 19 | C | 1.15 (0.95–1.38) | 0.14 | — | — |
| NLRP3 | rs4612666 | 1 | T | 1.29 (1.04–1.60)† | 0.02 | 1.06 (0.81–1.39)† | 0.68 |
| REL | rs13031237 | 2 | T | 1.15 (0.85–1.53)§ | 0.36 | 1.15 (0.78–1.70)§ | 0.47 |
| REL | rs842647 | 2 | A | 1.10 (0.93–1.31) | 0.27 | — | — |
| REL | rs13017599 | 2 | A | 1.04 (0.89–1.21) | 0.64 | 1.02 (0.83–1.25) | 0.86 |
| RELA | rs11820062 | 11 | T | 0.91 (0.78–1.05) | 0.2 | — | — |
| RELA | rs2306365 | 11 | A | 1.02 (0.81–1.28) | 0.86 | — | — |
| RELA | rs7119750 | 11 | T | 1.04 (0.82–1.30) | 0.76 | — | — |
| TLR10 | rs11096957 | 4 | A | 1.13 (0.98–1.32) | 0.1 | 0.75 (0.60–0.93) | 0.01 |
| TLR4 | rs4986791 | 9 | T | 1.15 (0.83–1.60) | 0.4 | — | — |
| TLR5 | rs5744174 | 1 | C | 1.03 (0.88–1.20) | 0.75 | — | — |
| TLR9 TWF2 | rs187084 | 3 | T | 0.93 (0.80–1.09) | 0.39 | — | — |
| TRAF1 C5 | rs3761847 | 9 | A | 1.00 (0.86–1.17) | 0.99 | — | — |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de único nucleótido; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza. El meta-análisis se realizó de acuerdo un modelo *random*. ^ΔAnálisis realizado según el modelo de herencia aditivo y ajustado por edad, sexo y país de origen. [†]Análisis realizado según el modelo de herencia dominante y ajustado por edad, sexo país de origen. [§]Análisis realizado según el modelo de herencia recesivo y ajustado por edad, sexo y país de origen. *P* ≤ 0.05 en negrita.

Tabla 32. Análisis de haplotipos de la población total y estratificada por anti-CCP asociada con el AR.

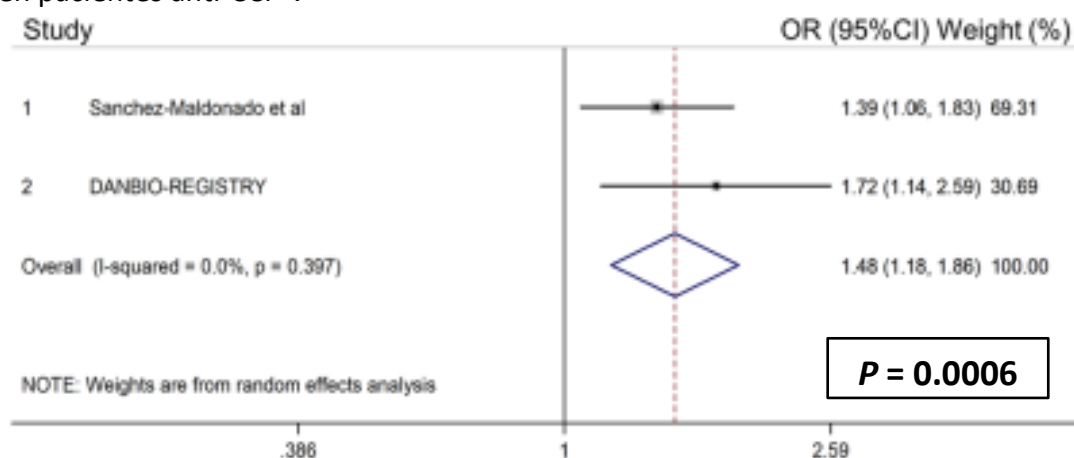
| <i>NFκB2</i> | | | | Pacientes AR (n=4210) | |
|--------------|-----------|------|-------------|-------------------------|--------------|
| rs11574851 | rs1276931 | Freq | OR (95% CI) | | <i>P</i> |
| 1 | C | C | 0.82 | 1 | — |
| 2 | C | T | 0.11 | 1.14 (0.99–1.31) | 0.07 |
| 3 | T | T | 0.06 | 1.18 (0.98–1.42) | 0.13 |
| 4 | T | C | 0.01 | 2.21 (1.37–3.56) | 0.001 |

| <i>NFκB2</i> | | | | Paciente con anti-CCP positivo (n=3117) | |
|--------------|-----------|------|-------------|---|--------------|
| rs11574851 | rs1276931 | Freq | OR (95% CI) | | <i>P</i> |
| 1 | C | C | 0.82 | 1 | — |
| 2 | C | T | 0.17 | 1.10 (0.92–1.32) | 0.3 |
| 3 | T | T | 0.05 | 1.39 (1.11–1.74) | 0.004 |
| 4 | T | C | — | — | — |

| <i>NFκB2</i> | | | | Pacientes anti-CCP negativo (n=2688) | |
|--------------|-----------|------|-------------|--------------------------------------|----------|
| rs11574851 | rs1276931 | Freq | OR (95% CI) | | <i>P</i> |
| 1 | C | C | 0.83 | 1 | — |
| 2 | C | T | 0.11 | 1.02 (0.79–1.30) | 0.91 |
| 3 | T | T | 0.05 | 1.04 (0.75–1.44) | 0.82 |
| 4 | T | C | — | — | — |

[†]Análisis realizado según el modelo de herencia dominante. La frecuencia haplotípica mínima considerada fue de 0.01. *P* < 0.05 en negrita.

Figura 36. Meta-análisis de la asociación entre el SNP *NFκB*_{rs11574851} y el riesgo de AR en pacientes anti-CCP⁺.



Asociación estimada de acuerdo con el modelo de efecto *random*. *P*_{Meta} = 0.0006.

3. Análisis de asociación de las variantes en la vía NFκB y la respuesta a fármacos anti-TNF.

Cuando evaluamos el efecto de los SNPs seleccionados sobre la respuesta a fármacos anti-TNF (definida como el cambio en valores absolutos del DAS28 a los 6 meses de tratamiento), observamos un efecto significativo del SNP *NFκB2*_{rs1056890} para modular la respuesta a fármacos anti-TNF a nivel nominal ($P < 0.05$). Cada copia del alelo *NFκB2*_{rs1056890T} aumentaba aditivamente la caída del valor de DAS28 en un 22% tras el tratamiento con fármacos anti-TNF ($OR_{Alélica} = 1.22$, 95% CI 1.03–1.44, $P = 0.025$; Tabla 33). Cuando intentamos replicar este resultado a través de un meta-análisis con las poblaciones de replicación de los registros DREAM y DANBIO ($n = 2.107$), pudimos confirmar que los pacientes portadores del alelo *NFκB2*_{rs1056890T} tenían una respuesta significativamente mejor que aquellos que portaban el alelo de referencia ($OR_{Meta} = 1.18$, 95% CI 1.05–1.33, $P = 0.0077$, $I^2 = 51.7\%$, $P_{Heterogeneidad} = 0.13$; Figura 37). Aunque esta asociación no permaneció significativa después de la corrección por comparaciones múltiples y, por lo tanto, necesita ser validada, estos hallazgos apuntan a que el SNP *NFκB2*_{rs1056890} podría estar modulando la respuesta a fármacos anti-TNF probablemente a través de la regulación de la respuesta inmunitaria mediada por *NFκB2*.

Para evaluar dicha hipótesis, analizamos si el marcador genético *NFκB2*_{rs1056890} estaba asociado con los niveles de citocinas y hormonas esteroideas en la cohorte 500FG del HFGP. Aunque este SNP no estaba disponible en los datos de GWAS de la cohorte 500FG, pudimos evaluar la asociación de este marcador con citocinas y niveles de hormonas esteroideas a través del análisis de un SNP vecino que estaba en completo desequilibrio de ligamiento con él. Nuestros experimentos de estimulación *in vitro* mostraron que los PBMCs de portadores del alelo *NFκB2*_{rs1005044C} (en LD completo con el alelo rs1056890T, $r^2 = 1.00$) tenía una mayor producción de IL10 tras la estimulación de los PBMCs con LPS durante 24 horas ($P = 0.0025$; Figura 38). El análisis de otros SNPs en el mismo bloque de ligamiento nos permitió confirmar la asociación del alelo rs1056890T con el incremento de los niveles de la citocina IL10. Aunque la asociación del SNP *NFκB2*_{rs1056890} con una mejor respuesta a fármacos anti-TNF y su correlación con mayores niveles de IL10 no permanecía significativa tras la corrección por comparaciones múltiples, en conjunto, estos hallazgos apuntan a un papel de este marcador para determinar la respuesta a inhibidores del TNF, probablemente a través de la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL10. Cuando analizamos si la asociación de la variante *NFκB2*_{rs1056890} con la respuesta a fármacos inhibidores de TNF dependía de la presencia de los anti-CCP, pudimos descartar la implicación de los autoanticuerpos en el efecto funcional atribuido a este polimorfismo. Además, es importante mencionar que no encontramos ninguna correlación entre esta variante y los niveles de hormonas esteroideas, lo que también descartó la posibilidad de la

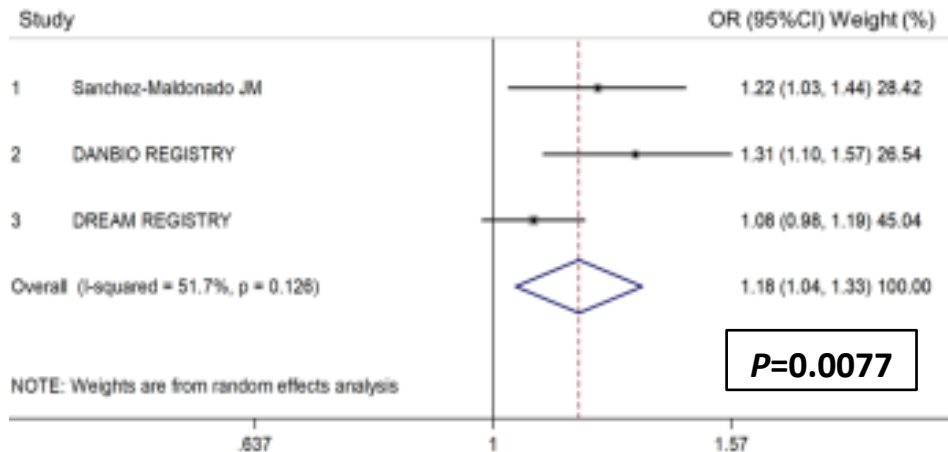
implicación de las hormonas esteroideas en la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL10.

Tabla 33. Meta-análisis de la asociación de los SNPs en la vía NFκB y el cambio relativo del DAS28.

| Genes | ID SNP | Cr. | Población REpAIR (n=604) | | Población de replicación DREAM (n=882) | | Población de replicación DANBIO(n=621) | |
|----------------------|--------------|-----|-----------------------------|--------------|---|--------------|---|--------------|
| | | | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P |
| <i>GBP6</i> | rs928655_A | 1 | 1.05 (0.87–1.27) | 0.61 | 0.90 (0.80–1.00) | 0.058 | ND | ND |
| <i>IKBKB</i> | rs11986055_A | 8 | 0.74 (0.48–1.11) | 0.14 | 0.85 (0.66–1.07) | 0.17 | 0.94 (0.64–1.39) | 0.76 |
| <i>IRF4</i> | rs1050975_A | 6 | 0.95 (0.72–1.24) | 0.69 | 0.99 (0.83–1.17) | 0.87 | 1.24 (0.94–1.65) | 0.13 |
| <i>IRF4</i> | rs12203592_T | 6 | 1.01 (0.77–1.33) | 0.93 | ND | ND | ND | ND |
| <i>IRF4</i> | rs1877175_T | 6 | 1.09 (0.90–1.33) | 0.37 | 0.92 (0.82–1.13)* | 0.15 | 0.90 (0.75–1.09) | 0.3 |
| <i>IRF4</i> | rs7768807_T | 6 | 0.86 (0.72–1.03) | 0.1 | 1.04 (0.93–1.16)* | 0.52 | ND | ND |
| <i>KLRC1</i> | rs7301582_T | 12 | 1.05 (0.86–1.27) | 0.62 | 1.00 (0.88–1.12) | 0.94 | 0.99 (0.80–1.22) | 0.92 |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs1049174_C | 12 | 1.08 (0.91–1.29) | 0.37 | 0.96 (0.86–1.08) | 0.53 | 1.07 (0.90–1.27) | 0.47 |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs1154831_A | 12 | 0.89 (0.73–1.10) | 0.28 | 1.05 (0.93–1.19)* | 0.4 | ND | ND |
| <i>KLRK1 KLRC4</i> | rs2255336_A | 12 | 1.09 (0.90–1.33) | 0.38 | 1.01 (0.89–1.16) | 0.81 | ND | ND |
| <i>LOC105376246</i> | rs2722824_A | 9 | 1.03 (0.86–1.23) | 0.77 | 0.94 (0.85–1.05) | 0.32 | ND | ND |
| <i>NFκB1</i> | rs4648110_A | 4 | 1.07 (0.88–1.29) | 0.51 | 1.00 (0.89–1.13)* | 0.95 | ND | ND |
| <i>NFκB2</i> | rs11574851_T | 10 | 0.97 (0.73–1.29) | 0.83 | 0.92 (0.72–1.18)* | 0.53 | 0.78 (0.57–1.06) | 0.11 |
| <i>NFκB2</i> | rs12769316_T | 10 | 0.92 (0.75–1.13) | 0.43 | ND | ND | 0.86 (0.70–1.06) | 0.16 |
| <i>NFκB2 PSD</i> | rs1056890_T | 10 | 1.22 (1.03–1.44) | 0.025 | 1.08 (0.98–1.19) | 0.11 | 1.31 (1.10–1.57) | 0.003 |
| <i>NFκB1B</i> | rs3136645_C | 19 | 0.90 (0.73–1.11) | 0.34 | ND | ND | ND | ND |
| <i>NLRP3</i> | rs4612666_T | 1 | 1.05 (0.87–1.25) | 0.62 | 1.20 (1.05–1.37)* | 0.006 | 0.96 (0.80–1.14) | 0.62 |
| <i>REL</i> | rs13031237_T | 2 | 1.07 (0.91–1.26) | 0.4 | 1.03 (0.94–1.14) | 0.49 | 1.08 (0.92–1.28) | 0.36 |
| <i>REL</i> | rs842647_A | 2 | 1.03 (0.86–1.24) | 0.72 | 0.96 (0.87–1.06) | 0.45 | ND | ND |
| <i>REL</i> | rs13017599_A | 2 | 1.07 (0.91–1.27) | 0.41 | 1.03 (0.94–1.14) | 0.5 | 1.03 (0.86–1.21) | 0.78 |
| <i>RELA</i> | rs11820062_T | 11 | 1.07 (0.90–1.26) | 0.45 | 0.92 (0.84–1.01)* | 0.081 | ND | ND |
| <i>RELA</i> | rs2306365_A | 11 | 0.91 (0.71–1.16) | 0.45 | 1.19 (1.03–1.37) | 0.021 | ND | ND |
| <i>RELA</i> | rs7119750_T | 11 | 0.93 (0.73–1.18) | 0.54 | ND | ND | ND | ND |
| <i>TLR10</i> | rs11096957_A | 4 | 1.00 (0.85–1.19) | 0.98 | 0.99 (0.89–1.09) | 0.8 | ND | ND |
| <i>TLR4</i> | rs4986791_T | 9 | 1.15 (0.78–1.70) | 0.47 | 1.18 (0.98–1.41)* | 0.077 | ND | ND |
| <i>TLR5</i> | rs5744174_C | 1 | 0.99 (0.83–1.17) | 0.89 | ND | ND | ND | ND |
| <i>TLR9 TWF2</i> | rs187084_T | 3 | 1.02 (0.86–1.21) | 0.81 | 0.98 (0.88–1.08)* | 0.67 | ND | ND |
| <i>TRAF1 C5</i> | rs3761847_A | 9 | 1.08 (0.91–1.29) | 0.37 | 1.05 (0.95–1.16) | 0.33 | ND | ND |

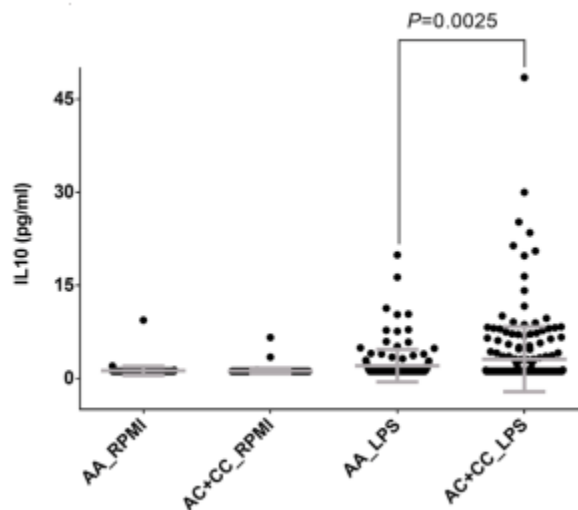
Abreviaturas: SNP, polimorfismo de único nucleótido; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza. El meta-análisis se realizó asumiendo un modelo de herencia aditivo y ajustado por edad, sexo y país de origen. $P \leq 0.05$ en negrita. Heterogeneidad no significativa.

Figura 37. Meta-análisis de la asociación de la variante $NF\kappa B2_{rs1056890}$ con la respuesta a fármacos anti-TNF.



Asociación estimada de acuerdo con el modelo de efecto aleatorio. **Pmeta= 0.0077.**

Figura 38. Correlación de los niveles de IL10 con el polimorfismo $NF\kappa B2_{rs1056890}$ tras la estimulación de PBMCs con LPS (n=377).



Correlación con IL10 fue analizada usando datos de genotipo del SNP $NF\kappa B2_{rs1005044}$, un marcador en completo desequilibrio de ligamiento con el rs1056890 ($r^2=1.00$).

4. Discusión.

Los datos de este estudio proporcionaron, por primera vez, evidencia de la implicación del locus $NF\kappa B2$ en la modulación del riesgo a desarrollar AR. El meta-análisis de los datos obtenidos de la población REPAIR con la población de replicación del registro DANBIO reveló una asociación potencialmente interesante entre el SNP $NF\kappa B2_{rs11574851}$ y el riesgo a desarrollar AR que se confirmó en el análisis de haplotipos. Además, encontramos que el efecto atribuido al locus $NF\kappa B2$ sobre el riesgo a desarrollar AR, dependía de la presencia de anti-CCP. El meta-análisis estratificado por anti-CCP que incluía 3712 sujetos mostró que los individuos con valores positivos para anti-CCP y que portaban el alelo $NF\kappa B2_{rs11574851T}$ tenían un aumento significativo del riesgo a desarrollar AR, mientras que ese efecto no se apreciaba en individuos con

valores negativos para los autoanticuerpos. Además, es importante destacar que, aunque la asociación del alelo *NFκB2*_{rs11574851T} con un mayor riesgo a desarrollar AR en individuos con anti-CCP positivos no superaba la corrección por comparaciones múltiples, esta asociación se confirmó mediante un análisis de haplotipos estratificado por anti-CCP. Este análisis reveló que la presencia del alelo *NFκB2*_{rs11574851T} guiaba el efecto del haplotipo *NFκB2*_{TA} sobre el riesgo a desarrollar AR en sujetos con anti-CCP positivo, pero no en individuos con anti-CCP negativo.

El gen *NFκB2* se encuentra en el cromosoma 10q24 y codifica para una subunidad del complejo *NFκB* (p100/p52) que se expresa en múltiples tipos de células inmunes y modula la inflamación. De igual modo se ha observado que *NFκB2* también está involucrado en procesos biológicos determinantes en la AR como son la diferenciación y activación de las células Th1, la apoptosis anormal y la diferenciación y proliferación de osteoclastos [425]. Además, es ampliamente conocido que la AR surge como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales y que la vía *NFκB* juega un papel central tanto en el inicio de la enfermedad como en su progresión. Por otra parte, se ha descrito que los factores genéticos y los factores ambientales que predisponen al desarrollo de AR son sustancialmente diferentes entre los individuos con valores positivos y negativos para anti-CCP. Estudios recientes han demostrado, por ejemplo, que el efecto atribuido a los dos los principales factores de riesgo genético para el desarrollo de la AR, (como son *HLADRB1-SE* y la variante del gen *PTPN22*) son claramente dependientes del estado del anti-CCP, siendo el efecto de estos genes más evidente en individuos anti-CCP positivos que aquellos que no presentan estos autoanticuerpos [551]. Asimismo, estudios recientes de GWAS han identificado la existencia de un componente genético o incluso un patrón de interacción gen-tabaquismo completamente diferente entre individuos con valores positivos y negativos para anti-CCP, de nuevo sugiriendo un papel relevante de los autoanticuerpos en el inicio de la enfermedad [552, 553]. Sin embargo, hasta ahora, se conoce poco sobre el efecto de los anti-CCP sobre el control de la vía de señalización *NFκB*. Investigaciones recientes han sugerido que el tratamiento de macrófagos derivados de PBMCs con anti-CCP indujo la activación de la vía *NFκB* y, posteriormente, la inducción del inflamasoma mediado por *NLRP3* y la producción de citocinas proinflamatorias [554]. Además, se ha demostrado que los anti-CCP inducen la activación de la vía *NFκB* mediante la inducción de la interacción entre *CD147* y la integrina $\beta 1$ o *ATGB1* que, a su vez, activa aguas abajo la vía de señalización *Akt/NFκB* dando lugar a una regulación positiva del *NLRP3* y la expresión de la pro-*IL1β* y la posterior activación del inflamasoma *NLRP3* [554]. Teniendo en cuenta estos datos, decidimos evaluar en la cohorte 500FG del HFGP[460-462] si había alguna correlación entre las variantes *NFκB2* y la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias tras la estimulación de sangre completa, PBMCs o macrófagos derivados de monocitos con LPS, PHA o Pam3Cys. También analizamos si estas variantes podrían afectar indirectamente a la respuesta inmunitaria mediada por las hormonas esteroideas. A pesar del uso de una gran cohorte de donantes sanos, no pudimos establecer ninguna correlación significativa entre los SNPs *NFκB2*_{rs11574851} y *NFκB2*_{rs12769316} y las citocinas o

los niveles de las hormonas esteroideas. Estos resultados sugirieron que estos marcadores genéticos podrían no ejercer su efecto sobre el riesgo a desarrollar AR a través de la modulación de la respuesta inmune mediada por *NFκB2* o hormonas esteroideas, no pudimos descartar esa posibilidad ya que su efecto podría depender de la presencia de los anti-CCP tal y como lo sugieren nuestros datos genéticos. En línea con esta hipótesis, en el análisis *in silicio* utilizando datos de Haploreg reveló que los SNPs *NFκB2*_{rs11574851} y *NFκB2*_{rs12769316} mapean entre sitios de unión a histonas en múltiples tipos celulares incluyendo células T cooperadoras primarias, células memoria y células primarias B de sangre periférica. Además, se ha predicho que podrían actuar como potenciadores en las células T colaboradores memoria y cambiar motivos de unión para factores de transcripción como Po6fu1, AP-4, CEBPB, Mef2 y RP58. Aunque estos datos apoyan la idea de que estas variantes en *NFκB2* puedan desempeñar un papel en la modulación de la respuesta inmunitaria, creemos que todavía son necesarios estudios adicionales para determinar si la presencia de anti-CCP o ciertos haplotipos podrían estar detrás del efecto del locus *NFκB2* sobre el riesgo a desarrollar AR.

Además del papel del locus *NFκB2* en la determinación del riesgo de AR, este estudio demostró un impacto notable de este gen sobre la modulación de la respuesta frente a fármacos inhibidores del TNF. En particular, el meta-análisis de la población REpAIR y las poblaciones de replicación de los registros de DREAM y DANBIO que incluían a 2107 pacientes con AR, mostró que los portadores del alelo *NFκB2*_{rs1056890T} tenían una mayor probabilidad de tener una caída del DAS28 tras el tratamiento con fármacos anti-TNF. Además, observamos que la dirección del efecto del SNP *NFκB2*_{rs1056890} sobre la respuesta a los fármacos anti-TNF fue similar en todas las poblaciones estudiadas y éste estadísticamente significativo en 2 de las 3 cohortes analizadas. Aunque llegado este punto resulta tentador especular que este SNP constituye un biomarcador para una buena respuesta a fármacos anti-TNF en pacientes con AR que podría ayudar a diseñar estrategias de tratamiento más individualizadas, la asociación no resistió la corrección por comparaciones múltiples y, por lo tanto, todavía son necesarios estudios adicionales que confirmen estos datos. A nivel mecanístico, encontramos que la presencia de los marcadores genéticos vecinos y en fuerte desequilibrio de ligamiento con el *NFκB2*_{rs1056890} estaban asociados con un incremento de los niveles de la citocina IL10, lo que sugería que *NFκB2* podría estar implicado en la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL10. Aunque la asociación del SNP *NFκB2*_{rs1056890} con los niveles de IL10 no sobrevivió a la corrección por comparaciones múltiples, estos resultados están en línea con estudios previos que demuestran que *NFκB2*, a diferencia del *NFκB1*, está implicado en el control de la función de la célula presentadora de antígeno y no en la activación de las células T y B. Asimismo, estudios recientes también han identificado polimorfismos genéticos dentro de la vía NFκB como biomarcadores genéticos para la respuesta a fármacos anti-TNF en AR [529] y otras enfermedades autoinmunes [529], lo que apoyaba nuestra hipótesis sugiriendo que el gen *NFκB2* tiene un papel clave en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF. Además, las herramientas *in silico* como Regulome

mostraron que el SNP $NF\kappa B2_{rs1056890}$ tiene una puntuación de 4, lo que significa que podría afectar a la afinidad de diferentes factores de transcripción y ADNAsas [555]. El uso de Haploreg además sugirió que el SNP $NF\kappa B2_{rs1056890}$ podría desempeñar un papel en la modulación de la respuesta inmunitaria, ya que mapea entre sitios de unión a histonas en las células T colaboradoras, células T reguladoras y células NK primarias. Finalmente, Haploreg también predijo que este marcador podría alterar motivos de unión para NRSF, Sin3A κ -20 y PLAGA1 que son factores de transcripción implicados en el desarrollo de enfermedades relacionadas con los huesos [556] ya que su activación resulta en la sobreexpresión de múltiples genes diana, incluidos genes relacionados con el sistema inmunitario, tales como son el factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF) y factor de crecimiento de insulina (IGF)-2.

Validar la asociación de las variantes genéticas identificadas en estudios GWAS con la respuesta frente a fármacos anti-TNF y arrojar algo de luz sobre los posibles mecanismos biológicos subyacentes a las asociaciones confirmadas.

ARTÍCULO Nº 4. Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts.

José Manuel Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Miguel Ángel López-Nevot³, Antonio José Cabrera-Serrano, Ana Moñiz-Díez, Helena Canhã, Rob ter Horst, Luca Quartuccio, Signe B Sorensen, Bente Glintborg, Merete Lund Hetland, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Jerzy Swierkot, Alfons A den Broeder, Salvatore De Vita, Eva Rabing Brix Petersen, Yang Li, Miguel A. Ferrer, Alejandro Escudero, Mihai G. Netea, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, João E. Fonseca, Manuel Jurado, Bogunia-Kubik K, Eduardo Collantes, Juan Sainz. **Frontiers in Immunology 2021_En revision.**



1 Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in 2 rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts

3 Jose Manuel Sánchez-Maldonado^{1,2,3}, Rafael Cáliz^{1,3,4}, Miguel Ángel López Nevot^{3,5}, Antonio
4 José Cabrera-Serrano^{1,2,3}, Ana Moñiz-Díez^{1,2,3}, Helena Canhã^{6,7}, Rob ter Horst⁸, Luca
5 Quartuccio⁹, Signe B Sorensen^{10,11}, Bente Glintborg^{12,13}, Merete Lund Hetland^{12,13}, Ileana
6 Filipescu¹⁴, Eva Pérez-Pampin¹⁵, Pablo Conesa-Zamora¹⁶, Jerzy Swierkot¹⁷, Alfons A den
7 Broeder¹⁸, Salvatore De Vita⁹, Eva Rabing Brix Petersen¹⁹, Yang Li^{8,20}, Miguel A. Ferrer³,
8 Alejandro Escudero²¹, Mihai G. Netea^{8,22}, Marieke J. H. Coenen²³, Vibeke Andersen^{9,10,24}, João
9 E. Fonseca^{25,26}, Manuel Jurado^{1,2,3}, Bogunia-Kubik K²⁷, Eduardo Collantes²¹, Juan Sainz^{1,2,3,28}

68 Abstract

69 We aimed to validate the association of 28 GWAS-identified genetic variants for response to TNF
70 inhibitors (TNFi) in a discovery cohort of 1361 rheumatoid arthritis (RA) patients monitored in routine
71 care and ascertained through the REPAIR consortium and DANBIO registry. We genotyped selected
72 markers and evaluated their association with response to TNFi after 6 months of treatment according
73 to the change in disease activity score 28 (Δ DAS28). Next, we confirmed the most interesting results
74 through meta-analysis of our data with those from the DREAM cohort that included 706 RA patients
75 treated with TNFi. The meta-analysis of the discovery cohort and DREAM registry including 2067 RA
76 patients revealed an overall association of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP with a lower improvement in
77 DAS28 that remained significant after correction for multiple testing (per-allele $OR_{Meta}=0.83$,
78 $P_{Meta}=0.000077$; $P_{Het}=0.61$). In addition, we found that each copy of the *LRRCS55*_{rs717117G} allele was
79 significantly associated with lower improvement in DAS28 in RF-positive patients (per-allele
80 $OR_{Meta}=0.67$, $P=0.00058$; $P_{Het}=0.06$) whereas an opposite but not significant effect was detected in
81 RF-negative subjects (per-allele $OR_{Meta}=1.38$, $P=0.10$; $P_{Het}=0.45$; $P_{Interaction}=0.00028$). Interestingly,
82 although the identified associations did not survive multiple testing correction, the meta-analysis also
83 showed overall and rheumatoid factor (RF)-specific associations for the *MAFB*_{rs6071980} and
84 *CNTN5*_{rs1813443} SNPs with decreased changes in DAS28 (per-allele $OR_{Meta_rs6071980}=0.85$, $P=0.0059$;
85 $P_{Het}=0.63$ and $OR_{Meta_rs1813443_RF+}=0.81$, $P=0.0059$; $P_{Het}=0.69$ and $OR_{Meta_rs1813443_RF-}=1.00$, $P=0.99$;
86 $P_{Het}=0.12$; $P_{Interaction}=0.032$). Mechanistically, we found that subjects carrying the *LINC02549*_{rs7767069T}
87 allele had significantly increased numbers of CD45RO+CD45RA+ T cells ($P=0.000025$) whereas
88 carriers of the *LINC02549*_{rs7767069TT} genotype showed significantly increased levels of soluble
89 scavengers CD5 and CD6 in serum ($P=0.00037$ and $P=0.00041$). In addition, carriers of the
90 *LRRCS55*_{rs717117G} allele showed decreased production of IL6 after stimulation of PBMCs with *B*
91 *burgdorferi* and *E coli* bacteria ($P=0.00046$ and $P=0.00044$), which suggested a reduced IL6-mediated
92 anti-inflammatory effect of this marker to worsen the response to TNFi. In conclusion, this study
93 confirmed the influence of the *LINC02549* and *LRRCS55* loci to determine the response to TNFi in RA
94 patients and suggested a weak effect of the *MAFB* and *CNTN5* loci that need to be further investigated.

1. Características de la población de estudio.

La población de estudio en este trabajo consiste en 2067 pacientes con AR tratados con fármacos inhibidores de TNF. La cohorte principal está constituida por 1361 individuos que pertenecen al consorcio internacional REpAIR y como población al registro DANBIO (Tabla 34). Conjuntamente hemos usado en el estudio una población de replicación que es el registro DREAM formada por 706 pacientes con AR (Tabla 34). La edad media de las dos poblaciones fue similar, en el consorcio REpAIR + registro DANBIO 52 ± 14 y en el registro DREAM 55 ± 13 . El 67% y el 78% de los pacientes con AR presentan valores positivos para FR; la duración media de la enfermedad y DAS28 en nuestra población tienen los siguientes valores 13 años y 5.91 en la población constituida por el consorcio REpAIR + registro DANBIO, mientras que en la población de replicación del registro DREAM es de 10 años y 5.33 (Tabla 34).

Análisis de respuesta asociado con una caída del DAS28 en pacientes tratados con fármaco inhibidores del TNF (n=2067)

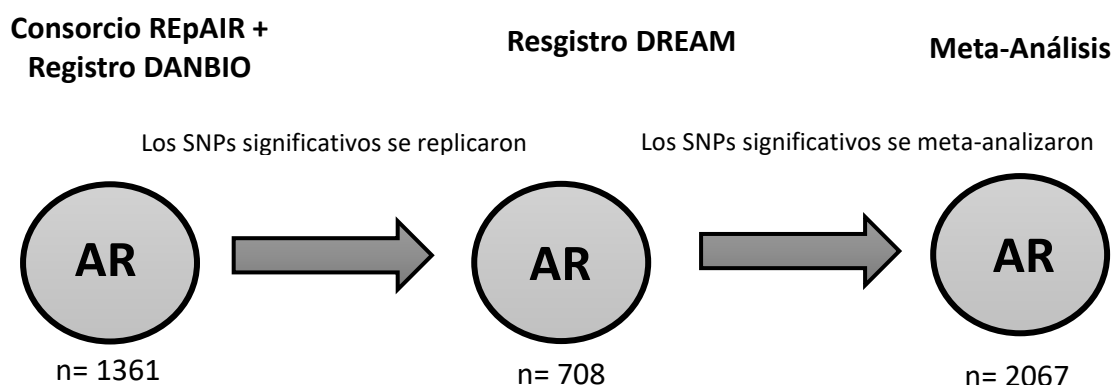


Tabla 34. Características demográficas y clínicas.

| Características Demográficas | REpAIR + Registro DANBIO | Registro DREAM † |
|----------------------------------|--------------------------|------------------|
| Edad (años) | 52.20 ± 14.49 | 54.59 ± 12.78 |
| Ratio del Género (mujer/hombre) | 3.39 (1050/310) | 2.07 (476/228) |
| Evaluación Clínica | | |
| Pacientes FR-positivo* | 721 (67.45) | 532 (77.55) |
| Pacientes anti-CCP-positivo* | 728 (64.03) | 150 (62.24) |
| DAS28 en estado basal | 5.91 ± 1.23 | 5.33 ± 1.26 |
| Duración de la enfermedad (años) | 12.92 ± 12.90 | 9.70 ± 9.57 |
| Tratamientos | | |
| Primer Agente Biológico | | |
| Infliximab (%) | 386 (28.36) | 243 (34.41) |
| Etanercept (%) | 466 (34.24) | 130 (18.41) |
| Adalimumab (%) | 413 (30.35) | 333 (47.17) |
| Golimumab (%) | 48 (03.53) | - |
| Certolizumb (%) | 67 (04.04) | - |
| Biosimilares Infliximab (%) | | |

2. Análisis de asociación de los SNPs identificadas en estudios GWAS en respuesta a fármacos inhibidores de TNF.

Todos los SNPs incluidos en el estudio no mostraron desviación del HWE en la población de control (el grupo control se realizó con los respondedores según los criterios EULAR; $P > 0.001$). Las variantes presentaron una alta capacidad de genotipado ($>90\%$), con excepción del SNP *LINC01387*_{rs4411591}, es por ello que este SNP fue excluido del análisis estadístico (Tabla 35).

Tabla 35. Variantes genéticas identificadas en GWAS asociadas con respuesta a fármacos anti-TNF.

| Genes | dbSNP rs# | Cr. | NS | Localización |
|--|--------------|-----|-----|--------------|
| <i>ALPL</i> | rs885813_T | 1 | C/T | Intronic |
| <i>ALPL</i> | rs885814_T | 1 | C/T | Intronic |
| <i>CNTN5</i> | rs1813443_C | 11 | G/C | Intronic |
| <i>CREBBP</i> | rs8046065_T | 16 | C/T | Intronic |
| <i>CST2</i> <i>CST5</i> | rs6138150_C | 20 | C/T | Intergenic |
| <i>HSPEP1</i> <i>MAFB</i> | rs6028945_T | 20 | G/T | Intergenic |
| <i>HSPEP1</i> <i>MAFB</i> | rs6071980_C | 20 | C/T | Intergenic |
| <i>IFNK</i> <i>C9orf72</i> | rs3849942_T | 9 | T/C | ncRNA |
| <i>LASS6</i> | rs13393173_A | 2 | A/G | Intronic |
| <i>LINC01387</i> | rs4411591_A | 18 | C/T | Intronic |
| <i>LMO4</i> <i>PKN2</i> | rs983332_A | 1 | A/C | Intergenic |
| <i>C9orf47</i> <i>LOC100128660</i> <i>LOC100128911</i> | rs1875620_A | 9 | A/G | Intergenic |
| <i>CBLN2</i> <i>LOC100132647</i> | rs1539909_A | 18 | A/G | Intronic |
| <i>LOC102723883</i> <i>LINC02549</i> | rs7767069_T | 6 | A/T | Downstream |
| <i>LOC107986770</i> <i>ETV1</i> | rs1568885_T | 7 | A/T | Intronic |
| <i>LINC00924</i> | rs10520789_A | 15 | A/G | Downstream |
| <i>MAP2K6</i> <i>KCNJ16</i> | rs11870477_C | 17 | A/C | Intronic |
| <i>NUBPL</i> | rs2378945_A | 14 | G/A | Intronic |
| <i>OR5BP1P</i> <i>LRR55</i> | rs717117_G | 11 | A/G | Intronic |
| <i>PDZD2</i> | rs1532269_G | 5 | C/G | Intronic |
| <i>PLA2G4A</i> <i>FDPSL1</i> | rs4651370_A | 1 | A/T | Intronic |
| <i>PPP1R9A</i> | rs854547_G | 7 | A/G | 3'UTR |
| <i>PPP1R9A</i> <i>PON1</i> | rs854548_A | 7 | A/G | Downstream |
| <i>QKI</i> <i>LOC728275</i> | rs10945919_G | 6 | A/G | Intronic |
| <i>CENTD1</i> | rs437943_G | 4 | A/G | Upstream |
| <i>SLC01C1</i> | rs3794271_C | 12 | C/T | Intronic |
| <i>TEC</i> | rs4694890_C | 4 | A/C | Intronic |
| <i>TRMT112P5</i> | rs1447722_C | 3 | C/G | Intergenic |

MAF, mínima frecuencia alélica, SNP: polimorfismo de único nucleótido, UTR: región no traducible, SN: Sustitución Nucleotídica.

En la población principal constituida por las cohortes del consorcio REAPIR y registro DANBIO se realizó un análisis de regresión lineal, que incluía a 1361 pacientes con AR tratados con fármacos inhibidores de TNF, mostrando que las variantes *MAFB*_{rs6028945}, *MAFB*_{rs6071980}, *LINC02549*_{rs7767069}, y *LRR55*_{rs717117} tienen un efecto significativo sobre la

respuesta a fármacos inhibidores TNF ($OR_{\text{Dominante}}=0.81$, 95% CI 0.68-0.97, $P=0.020$; $OR_{\text{Alélica}}=0.83$, 95% CI 0.72-0.97, $P=0.020$; $OR_{\text{Alélica}}=0.85$, 95% CI 0.76-0.96, $P=0.008$; $OR_{\text{Alélica}}=0.76$, 95% CI 0.60-0.97, $P=0.026$; Tabla 36). Dichos resultados se replicaron en el registro DREAM, realizándose un meta-análisis, en el cual se validó el SNP *LINC02549*_{rs7767069} (marcador que sobrevivió al test de múltiples comparaciones) asociado con bajo DAS28 ($OR_{\text{Meta-Alélica}}=0.83$, 95% CI 0.76-0.91, $P_{\text{Meta}}=0.000077$; $P_{\text{Het}}=0.61$; Tabla 37). Aunque la variante *MAFB*_{rs6071980} no ha sobrevivido a la corrección de múltiples comparativas, consideramos que pueden ser un resultado potencialmente interesante, ya que se observa una menor mejora en el DAS28, en la respuesta a tratamientos anti-TNF (por alelo $OR_{\text{Meta_rs6071980}}=0.85$, 95% CI 0.76-0.95, $P=0.0059$; $P_{\text{Het}}=0.63$; Tabla 36).

Tabla 36. Estudio de asociación en la población general y estratificada por FR de polimorfismos seleccionados de TNF (definido por DAS28).

| Genes | ID SNP | RepAIR+DANBIO (n=1361) | | RepAIR+DANBIO_FR+ (n=721) | |
|---------------------------------------|----------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|----------------|
| | Efecto alélico | OR (95% CI) ^d | P | OR (95% CI) ^d | P |
| ALPL | rs885813_T | 0.96 (0.86-1.07) | 0.48 | 1.06 (0.91-1.22) | 0.47 |
| ALPL | rs885814_T | 0.96 (0.85-1.07) | 0.45 | 0.91 (0.78-1.06) | 0.24 |
| CNTN5 | rs1813443_C | 0.97 (0.84-1.13) [†] | 0.72 | 0.79 (0.65-0.97)[†] | 0.023 |
| CREBBP | rs8046065_T | 1.01 (0.87-1.19) | 0.85 | 1.18 (0.96-1.45) | 0.11 |
| CST2 CST5 | rs6138150_C | 1.06 (0.92-1.22) | 0.40 | 1.04 (0.87-1.26) | 0.66 |
| HSPEP1 MAFB | rs6028945_T | 0.81 (0.68-0.97)[†] | 0.020 | 0.89 (0.70-1.21) [†] | 0.31 |
| HSPEP1 MAFB | rs6071980_C | 0.83 (0.72-0.97)[†] | 0.020 | 0.85 (0.70-1.03) | 0.10 |
| IFNK C9orf72 | rs3849942_T | 1.02 (0.90-1.15) | 0.74 | 0.93 (0.79-1.10) | 0.39 |
| LASS6 | rs13393173_A | 1.10 (0.96-1.25) | 0.19 | 1.08 (0.91-1.28) | 0.41 |
| LMO4 PKN2 | rs983332_A | 1.12 (0.97-1.29) | 0.11 | 1.14 (0.95-1.38) | 0.16 |
| C9orf47 LOC100128660 LOC100128911 | rs1875620_A | 0.94 (0.84-1.04) | 0.24 | 0.93 (0.81-1.08) | 0.34 |
| CBLN2 LOC100132647 | rs1539909_A | 0.96 (0.81-1.13) | 0.62 | 0.88 (0.70-1.10) | 0.27 |
| LOC102723883 LINC02549 | rs7767069_T | 0.85 (0.76-0.96)[†] | 0.008 | 0.91 (0.78-1.08) | 0.28 |
| LOC107986770 ETV1 | rs1568885_T | 0.67 (0.40-1.10) [§] | 0.11 | 0.84 (0.42-1.66) [§] | 0.61 |
| LOC400456 LOC100132798 | rs10520789_A | 1.03 (0.86-1.22) | 0.76 | 1.14 (0.90-1.44) | 0.29 |
| MAP2K6 KCNJ16 | rs11870477_C | 1.07 (0.91-1.25) | 0.42 | 0.92 (0.74-1.14) | 0.46 |
| NUBPL | rs2378945_A | 1.02 (0.91-1.13) | 0.79 | 1.06 (0.91-1.24) | 0.44 |
| OR5BP1P LRRC55 | rs717117_G | 0.76 (0.60-0.97)[†] | 0.026 | 0.54 (0.39-0.74)[†] | 0.00012 |
| PDZD2 | rs1532269_G | 1.01 (0.88-1.16) | 0.86 | 1.03 (0.89-1.20) | 0.68 |
| PLA2G4A FDP1L1 | rs4651370_A | 1.05 (0.90-1.23) | 0.53 | 1.09 (0.88-1.35) | 0.42 |
| PPP1R9A | rs854547_G | 1.00 (0.89-1.11) | 0.95 | 1.03 (0.89-1.19) | 0.71 |
| PPP1R9A PON1 | rs854548_A | 1.01 (0.89-1.15) | 0.89 | 1.04 (0.87-1.24) | 0.67 |
| QKI LOC728275 | rs10945919_G | 0.88 (0.76-1.03) [†] | 0.11 | 0.79 (0.64-0.97)[†] | 0.027 |
| SEC63P3 | rs437943_G | 1.10 (0.95-1.28) [†] | 0.21 | 0.98 (0.80-1.20) [†] | 0.82 |
| SLCO1C1 | rs3794271_C | 0.95 (0.85-1.07) | 0.39 | 0.96 (0.82-1.11) | 0.57 |
| TEC | rs4694890_C | 0.96 (0.86-1.07) | 0.42 | 1.01 (0.87-1.17) | 0.86 |
| TRMT112P5 | rs1447722_C | 1.03 (0.92-1.15) | 0.61 | 1.01 (0.87-1.18) | 0.85 |

Abreviaciones: SNP, polimorfismo de único nucleótido; OR, odd ratio; CI, intervalo de confianza. Pacientes con RF en este trabajo fue 1.069. Los estudios fueron ajustados por edad, sexo y país de origen, $P < 0.05$.[§]Modelo de herencia log-aditivo Asociación calculada para modelo. [†]Asociación calculada para modelo de herencia dominante y. [§]Asociación calculada para modelo de herencia recesivo.

En un análisis estratificado por FR demostramos que el SNP *LRRC55*_{rs717117} asocia estadísticamente significativo con la respuesta a fármacos inhibidores de TNF tras la corrección de múltiples comparativas en la población del consorcio REpAIR más el registro DANBIO. Por tanto, los pacientes seropositivos portadores del alelo *LRRC55*_{rs717117G} aditivamente desciende la caída en el DAS28 ($OR_{Alélica} = 0.54$, 95% CI 0.39–0.74, $P = 0.00012$), mientras que los pacientes FR negativos muestra una dirección inversa y no significativa ($OR_{Alélica} = 1.52$, 95% CI 0.96–2.42, $P = 0.07$; $P_{Interacción} = 0.00028$; Tabla 36). Interesantemente, nuestro meta-análisis que incluye a 2.067 pacientes (Consortio REpAIR + registro DANBIO, junto con el registro DREAM) confirma el efecto específico relacionado con RF de este SNP modulando la respuesta a fármacos inhibidores de TNF ($OR_{Meta\ Alélica_RF+} = 0.67$, 95%CI 0.54-0.84, $P_{Meta} = 0.00058$; $P_{Het} = 0.06$ y $OR_{Meta\ Alélica_RF-} = 1.38$, 95% CI 0.94-2.02, $P = 0.10$; $P_{Het} = 0.45$; $P_{Interacción} = 0.00028$; Tabla 37). Es importante mencionar, que aun no superando la corrección por múltiples comparativas, el resultado obtenido en el meta-análisis para la variante *CNTN5*_{rs1813443} muestra una asociación potencialmente interesante para pacientes FR específicos con un descenso de la caída del DAS28 ($OR_{Meta_rs1813443_RF+} = 0.81$, 95% CI 0.70-0.94, $P = 0.0059$; $P_{Het} = 0.69$ y $OR_{Meta_rs1813443_RF-} = 1.00$, 95% CI 0.79-1.27, $P = 0.99$; $P_{Het} = 0.12$; $P_{Interacción} = 0.032$; Tabla 37).

Tabla 37. Meta-análisis en la población general y estratificada por FR de los polimorfismos *CNTN5*_{rs1813443}, *LRR55*_{rs717117} y la respuesta a fármacos anti-TNF (definido por DAS28).

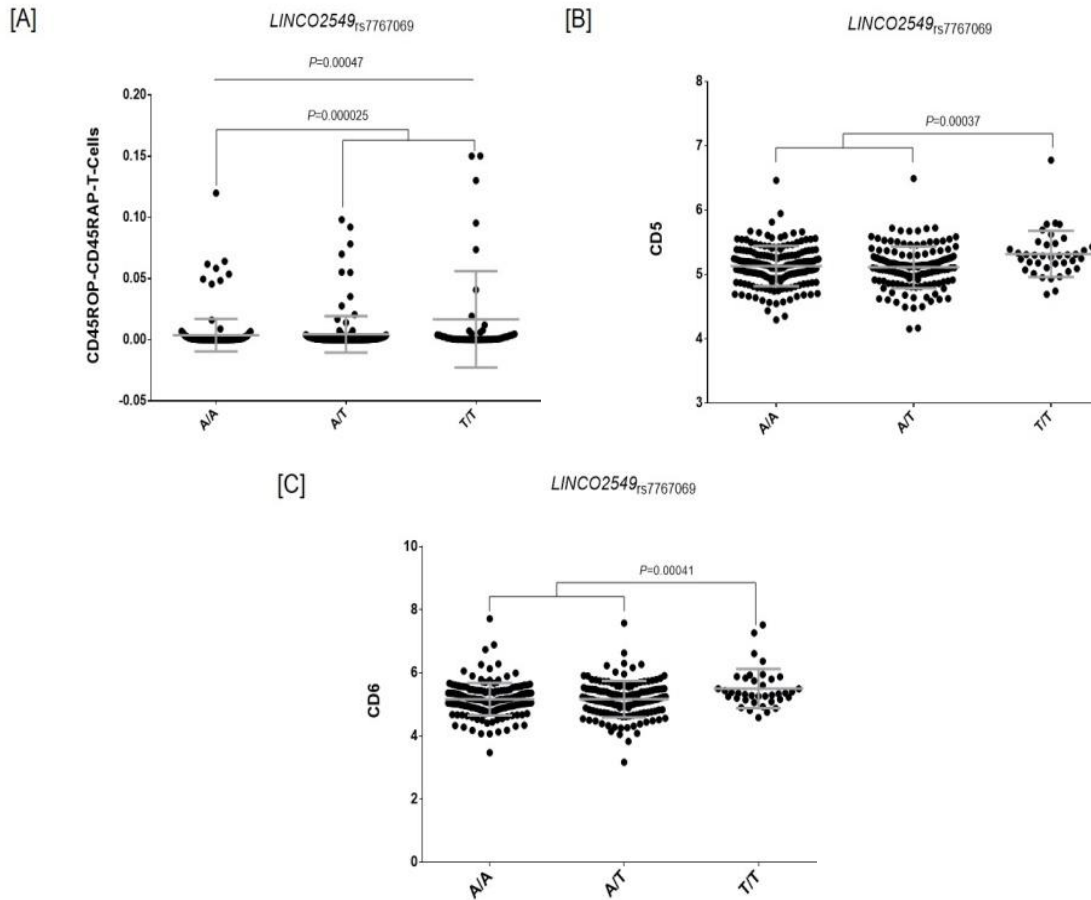
| Genes | ID SNP# | REpAIR+DANBIO (n=1361) | | Registro DREAM (n=706) | | |
|---|-------------|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------|
| | | Efecto alélico | OR (95% CI) ^d | P | OR (95% CI) ^d | P |
| <i>CNTN5</i> | rs1813443_C | | 0.97 (0.84-1.13) [†] | 0.72 | 0.82 (0.68-1.00)[†] | 0.046 |
| <i>HSPEP1</i> <i>MAFB</i> | rs6071980_C | | 0.83 (0.72-0.97) | 0.020 | 0.88 (0.73-1.06) | 0.18 |
| <i>LOC102723883</i> <i>LINCO2549</i> | rs7767069_T | | 0.85 (0.76-0.96) | 0.008 | 0.80 (0.70-0.93) | 0.004 |
| <i>OR5BP1P</i> <i>LRR55</i> | rs717117_G | | 0.76 (0.60-0.97) | 0.026 | 0.89 (0.67-1.20) | 0.46 |
| Genes | ID SNP# | Pacientes FR-positivos REpAIR+DANBIO (n=721) | | Pacientes FR-positivos Registro DREAM (n=532) | | |
| | | Efecto alélico | OR (95% CI) ^d | P | OR (95% CI) ^d | P |
| <i>CNTN5</i> | rs1813443_C | | 0.79 (0.65-0.97)[†] | 0.023 | 0.84 (0.67-1.04) [†] | 0.12 |
| <i>HSPEP1</i> <i>MAFB</i> | rs6071980_C | | 0.85 (0.70-1.03) | 0.10 | 0.85 (0.69-1.04) | 0.11 |
| <i>LOC102723883</i> <i>LINCO2549</i> | rs7767069_T | | 0.91 (0.78-1.08) | 0.28 | 0.82 (0.69-0.97) | 0.022 |
| <i>OR5BP1P</i> <i>LRR55</i> | rs717117_G | | 0.54 (0.39-0.74) | 0.00012 | 0.83 (0.60-1.15) | 0.28 |
| Genes | ID SNP# | Pacientes FR-negativos REpAIR+DANBIO (n=347) | | Pacientes FR-negativos Registro DREAM (n=154) | | |
| | | Efecto alélico | OR (95% CI) ^d | P | OR (95% CI) ^d | P |
| <i>CNTN5</i> | rs1813443_C | | 1.14 (0.86-1.53) [†] | 0.34 | 0.76 (0.50-1.16) [†] | 0.20 |
| <i>HSPEP1</i> <i>MAFB</i> | rs6071980_C | | 0.81 (0.58-1.14) | 0.23 | 1.10 (0.71-1.71) | 0.67 |
| <i>LOC102723883</i> <i>LINCO2549</i> | rs7767069_T | | 0.81 (0.65-1.01) | 0.058 | 0.76 (0.55-1.04) | 0.08 |
| <i>OR5BP1P</i> <i>LRR55</i> | rs717117_G | | 1.52 (0.96-2.42) | 0.07 | 1.10 (0.55-2.19) | 0.80 |

Abreviaciones: SNP, polimorfismo de único nucleótido; OR, odd ratio; CI, intervalo de confianza. Pacientes con RF en este trabajo edad, sexo y país de origen, $P < 0.05$.^δde herencia log-aditivo Asociación calculada para modelo. [†]Asociación calculada para modelo calculada para modelo de herencia recesivo.

3. Caracterización funcional de los resultados más relevantes.

Considerando los resultados genéticos descritos anteriormente, nosotros intentamos arrojar algunos rayos de luz al efecto encontrado en los SNPs *LINC02549*_{rs7767069}, *LRR55*_{rs717117}, *MAFB*_{rs6071980} y *CNTN5*_{rs1813443} para la modulación de la respuesta a fármacos inhibidores a TNF. Nuestros experimentos funcionales muestran que, cuando consideramos el número total de leucocitos en la variante *LINC02549*_{rs7767069} correlaciona significativamente con el incremento de células T CD45RO+CD45RA+ en sangre ($P=0.00047$; Figura 39A). Los individuos portadores del alelo *LINC02549*_{rs7767069T} (asociado con una pobre respuesta a fármacos inhibidores de TNF en AR) tiene un incremento significativo en el número de celular T CD45RO+CD45RA+ ($P=0.000025$), los que sugiere que este marcador genético podría influenciar en la respuesta a terapias inhibidores para TNF, por medio de la modulación de esta subpoblación de células T en sangre y, por tanto, contribuye a la inflamación. Además, nosotros observamos que estos pacientes que portan esta copia del alelo *LINC02549*_{rs7767069T} muestran un incremento significativo de niveles séricos de CD5 y CD6 que son receptores carroñeros solubles, en comparación a los portadores del genotipo A/T o A/A ($P=0.00037$ y $P=0.00041$; Figura 39B y 39C). Esto datos nos sugieren también el papel funcional del SNP *LINC02549*_{rs7767069} en la enfermedad, probablemente a través de los receptores solubles CD5/CD6 modulando ciertas subpoblaciones de célula T y B, encargadas del control de múltiples procesos entre los que se incluyen la adhesión celular, migración a través de células endoteliales y epiteliales, presentación de antígenos por células B y subsecuentemente la proliferación de células T.

Figura 39. Correlación de la variante LINC02549_{rs7767069} con el número de células T CD45RO+CD45RA+.

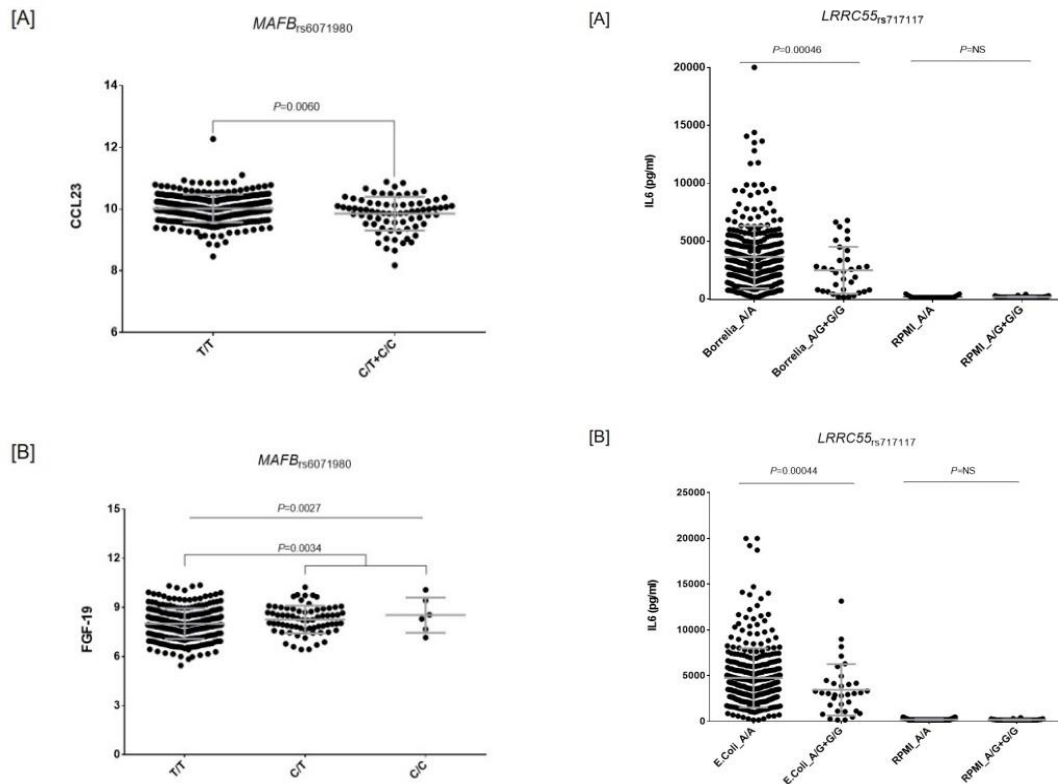


Aunque, la población utilizada para la realización de los experimentos funcionales no se ha podido estratificar por FR, debido a que son donantes sanos, si hemos encontrado que la presencia del alelo *LRRC55*_{rs717117G} muestra un descenso significativo en los niveles de la producción de IL6 después de la estimulación de los PBMCs con agentes bacterianos como son *Borrelia burgdorferi* (P=0.00046; Figura 40A) o *Escherichia coli* (P=0.00044; Figura 40B), que sugiere una implicación del locus *LRRC55* en la modulación de la respuesta a fármacos anti TNF mediante la regulación de la producción de la IL6 y probablemente la IL6 media en la diferenciación de las células T en células efectoras de células Th2. Los datos de Haploreg también muestran que la variante *LRRC55*_{rs717117T} correlaciona con los niveles de ARNm de *P2RX3*; Tal y como está descrito, este gen está involucrado en el control de la proliferación de las células T. Finalmente, nuestros experimentos funcionales revelan que los portadores del alelo *MAFB*_{rs6071980} muestra un descenso de los niveles de quemocinas (motivos C-C) ligando 23 (CCL23; P=0.0060; Figura 41A), y donde la proteína FGF-19 modula la inflamación por regulación de la producción de IL6, CCL23 ha sido implicada en el reclutamiento de monocitos durante la inflamación y ha sido previamente demostrado que hay una correlación positiva con la caída del DAS28 después del tratamiento con fármacos inhibidores de TNF. Aunque el efecto del polimorfismo *MAFB* está

relacionado con la modulación de los niveles séricos de FGF-19 o CCL23, a pesar de no sobrevivir la corrección por múltiples comparaciones, estos resultados nos podrían estar indicando un débil efecto del locus *MAFB* en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF.

Figura 40. Correlación de la variante *LRRC55*_{rs717117}, con los niveles de IL6.

Figura 41. correlación de la variante *MAFB*_{rs6071980} con CCL23 y FGF-19 modulando la inflamación en respuesta a fármacos anti-TNF, respectivamente.



4. Discusión.

Aunque el tratamiento biológico esencialmente usado para pacientes con AR son fármacos monoclonales anti-TNF ha sido una terapia particularmente apropiada para el control de la inflamación y para la prevención de la destrucción articular y la aparición de erosiones óseas, la falta de respuesta es frecuente y no se han identificado sistemáticamente biomarcadores eficaces para la predicción de la respuesta a estos medicamentos [489]. Este estudio de validación integral tuvo como objetivo confirmar la asociación de variantes asociadas con la respuesta a fármacos inhibidores TNF identificadas en trabajos GWAS para arrojar algo de luz sobre los mecanismos biológicos subyacentes a las asociaciones más interesantes. Por eso propusimos, un estudio genético de caso vs. control compuesto por 2.067 pacientes con AR tratados con fármacos anti-TNF comprobado por el consorcio REPAIR, pero también por las poblaciones DANBIO y DREAM. Los resultados más relevantes fueron descritos para la

variante *LINC02549*_{rs7767069} asociado con una pobre respuesta a fármacos anti-TNF. En el meta-análisis que constituía la población de estudio junto con la población de replicación se mostró que cada copia del alelo *LINC02549*_{rs7767069T} descendía significativamente la mejora del DAS28 en un 17% después de la administración de la terapia biológica anti-TNF. Es importante destacar la asociación de la variante *LINC02549*_{rs7767069} con una pobre respuesta a fármacos inhibidores para TNF, dicho resultado se ha descrito en ambas poblaciones analizadas y además se mantuvieron los resultados significativos después de la corrección por múltiples comparaciones, lo cual confirma un papel del locus *LINC02549*_{rs7767069} en la modulación de la respuesta frente a tratamientos anti-TNF.

LINC02549 (*Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2549*) es un gen ARN que está clasificado dentro de los lncRNA, que representa una larga proporción de transcritomas humanos mapeado en *LINC02549* (cromosoma 6) y está expresado en células T y en la activación de células T CD4. Aunque sus funciones aún son ampliamente desconocidas, nuestros datos sugieren que podría tener un papel en la determinación del número de células T CD45RO+CD45RA+ circulantes, que son una subpoblación de células T frecuentemente encontradas en el fluido sinovial de artritis crónicas [557] y en pacientes con AR [558]. De acuerdo con los resultados de Koch y colaboradores en 1990, los linfocitos T CD45RA+CD45RO+ están principalmente detectados en regiones perivasculares [558]., y que, una vez allí podría jugar un papel promoviendo principalmente la inflamación en el tejido sinovial por la inducción de la respuesta memoria inmunitaria. Por tanto, parece ser plausible sugerir el impacto negativo del SNP *LINC02549*_{rs7767069} sobre la respuesta a fármacos inhibidores de TNF mediada por su papel en la modulación en el número de linfocitos T CD45RA+CD45RO+ que podría migrar al tejido sinovial promoviendo la respuesta inflamatoria y, dificultar así el control de la inflamación durante el tratamiento con fármacos anti-TNF. En apoyo de esta hipótesis, nosotros encontramos que los portadores de dos copias para el alelo *LINC02549*_{rs7767069T} también muestran un incremento significativo en los niveles séricos de receptores carroñeros solubles CD5 y CD6, estas proteínas están altamente expresado en células T regulatorias y en una subpoblación de células B (CD5+ o B1a) [559]. Aunque el origen de estos receptores carroñeros solubles en AR es poco conocido, se ha sugerido que son eliminado del suero por proteasas de la superficie de linfocitos activados que posteriormente esas estructuras son infiltradas en el sinovio [560], de hecho, los pacientes diagnosticado de AR se ha descrito un aumento de los niveles séricos de CD5s y CD6s en AR [561-564], pero también en otra enfermedades autoinmunitarias tales como síndrome de Sjögren [562, 565, 566], síndrome respuesta inflamatoria sistémica [567], esclerosis múltiple [564] o dermatitis [568]. Aunque el papel funcional de ambos receptores en enfermedades autoinmunitarias todavía está en investigación, sí está establecido que CD5s y CD6s están regulando funciones de células Treg e inducen autoreactividad. Asimismo, se ha descrito que estos receptores son requeridos para la iniciación, diferenciación y mantenimiento de la respuesta

inmunitaria en células T [569, 570], pero también para la migración y extravasación de las células T al tejido sinovial [571]. Además, se ha informado que ambos receptores CD5s y CD6s están implicado en la modulación de la señalización de TCR y BCR y determina la supervivencia de las células T y B [572], y diferenciación de Th17 [573, 574]. Conjuntamente, usando ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales humanizados anti-CD6 se ha intentado evaluar el posible potencial de este marcador como diana terapéutica en pacientes con AR, pero también en psoriasis y potencialmente en otras enfermedades autoinmunitarias donde juega un papel pivotante y central las células B [575-577]. Investigaciones recientes también ha sugerido que alteraciones genéticas dentro del gen CD6 está vinculado con resultados clínicos en las principales enfermedades autoinmunitarias [564, 578] y correlacionada con la respuesta a fármacos inhibidores de TNF [579], señalando un papel relevante de estos receptores carroñeros solubles en la modulación de la respuesta a fármacos anti-TNF. Considerando estos hallazgos, nosotros hipotetizamos que aparte de su efecto sobre la modulación del número de linfocitos T CD45RA+CD45RO+, el SNP *LINC02549*_{rs7767069} podría influir negativamente en la respuesta a fármacos anti-TNF por la estimulación directa o indirectamente en la producción de CD5s y CD6s e induciendo así la respuesta inmunitaria mediadas por células T a largo plazo.

Otro resultado interesante que siguió siendo significativo después de la corrección por múltiples comparaciones fue el descrito en el análisis estratificado por FR, en el cual la variante *LRRC55*_{rs717117} está asociada con bajo cambio en el DAS28 después de suministrar fármacos inhibidores de TNF. El meta-análisis con ambas poblaciones de estudio mostró que pacientes seropositivos portadores del alelo *LRRC55*_{rs717117G} tenían un descenso significativo en la caída del DAS28, después del tratamiento con inhibidores de TNF, mientras que el efecto observado para los pacientes seronegativos iba en sentido opuesto y no era significativo. Notablemente, los experimentos funcionales mostraron que, después de la estimulación de PBMCs de sujetos sanos con bacterias *Borrelia burgdorferi* y *Escherichia coli*, los portadores del alelo *LRRC55*_{rs717117G} mostraban un descenso significativo en la producción de IL6 cuando se comparaban con los portadores del genotipo más común. Aunque los experimentos funcionales no se pudieron estratificar por FR, dado que el análisis se realizó con donantes sanos, estos resultados sugieren un papel del locus *LRRC55* en la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por IL6. Por otro lado, los datos funcionales de Haploreg también han sugerido una implicación del SNP *LRRC55*_{rs717117G} controlado la proliferación de células T mediante *P2PX3*.

El gen *LRRC55* está localizado en el cromosoma 11 y codifica para una proteína rica en repeticiones (55) de Leucina, una proteína que pertenece a la superfamilia de la LRRC formada por un centenar de proteínas, las cuales principalmente están expresadas en el cerebro. Las principales proteínas LRRC han sido ligadas con la regulación de canales iónicos [580], pero también se ha demostrado que las proteínas LRRC están implicadas en la modulación de la respuesta inmunitaria contra patógenos

bacterianos [581] y en la modulación del tráfico celular de receptores de membrana tales como TLR [582]. Aunque no se ha demostrado la interacción entre LRR55 e IL6, nuestros datos experimentales sugieren que el SNP *LRR55*_{rs717117} modula la producción de IL6 en la respuesta frente a bacterias y, por tanto, podría estar involucrado en otros procesos inmunitarios dependiente de IL6, que podría provocar la peor respuesta de estos pacientes a terapia inhibitoras de TNF.

Es ampliamente conocido que la IL6 puede inducir ambas respuestas inmunitarias, tanto antiinflamatorias como proinflamatorias, que dependen completamente de la vía de señalización activada. Mientras que la respuesta antiinflamatoria están mediada principalmente por la cascada de señalización clásica (a través de la unión al receptor de IL6 transmembrana), las respuesta proinflamatoria y la inflamación crónica están mediadas por la señalización trans (a través de la unión al receptor de IL6 soluble) o por la interacción de IL6R con gp130 [583, 584]. Considerando nuestros datos funcionales, es concebible sugerir que el SNP *LRR55*_{rs717117} podría afectar a la respuesta a fármacos anti-TNF por un descenso de la producción de IL6 y de esa manera inhibirse la vía clásica antiinflamatoria dependiente de IL6 y la desregulación de la vía proinflamatoria. De acuerdo con estos hallazgos, varios modelos de ratón han demostrado que la activación de la vía de señalización clásica de IL6 es esencial para la activación de ruta de señalización mediada por STAT3 que reducen la inflamación e inducen la regeneración del tejido afectado [585]. Además, se ha descrito que la IL6 es una de los factores más tempranos que disparan la diferenciación de las celular T inmaduras hacia células Th2 efectoras *in vitro* y que, cuando están ausente, el desarrollo de procesos inflamatorios se agravan [584].

Finalmente, aunque la asociación genética del SNP *MAFB*_{rs6071980} con la baja respuesta a fármacos inhibidores de TNF, no sobrevive la corrección por múltiples comparaciones, nosotros encontramos que la variante *MAFB*_{rs6071980} correlaciona con altos niveles en suero de FGF-19 y un descenso de los niveles de CCL23. Dado que la proteína PGP-19 es fundamental en la inhibición de inflamación intestinal [586, 587] y CCL23 ha sido positivamente correlacionada con el DAS28 en pacientes con AR [588]. Nosotros pensamos que se debería estudiar con mayor detalle el efecto de este SNP relacionado con la respuesta a fármacos anti-TNF en futuros estudios. Además, podría ser interesante analizar más a fondo la débil asociación del SNP *CNTN5*_{rs1813443} con una mala respuesta a fármacos inhibidores de TNF. Sin embargo, dado que no pudimos encontrar ningún impacto significativo de este marcador sobre la respuesta inmunitaria, en el recuento de células sanguíneas o proteínas inflamatorias séricas u hormonas esteroides, somos propensos a pensar que este SNP podría no tener un papel relevante en la modulación de la respuesta a terapias con inhibidores de TNF.

Este estudio tiene fortalezas y debilidades. Entre las fortalezas podemos destacar el uso de grandes poblaciones de pacientes con AR y bien caracterizadas que nos permitieron el desarrollo de un análisis de asociación general con un gran poder estadístico, pero también nos permitió investigar la modificación del efecto por estado específico de FR. En la población

general, tuvimos un poder de detección del 80% con una OR de 1.18 ($\alpha= 0.00089$) para un SNP con una frecuencia de 0.25. Por otro lado, cabe destacar el análisis exhaustivo del efecto funcional de las variantes genéticas más interesantes sobre la modulación de la respuesta inmunitaria, que se realizó utilizando un gran tamaño muestral para este tipo de estudios. Analizamos los datos de cQTL y hQTL, pero también analizamos 91 poblaciones de células derivadas de sangre y niveles séricos de 103 proteínas inmunológicas. Una limitación importante de este estudio fue la imposibilidad de estratificar por estatus de FR a los pacientes incluidos en los experimentos funcionales debido a su naturaleza, ya que era donantes sanos, incluidos y facilitados por la cohorte de HFGP [460-462].

Conclusiones



1. Las variantes genéticas relacionadas con vías de señalización, transporte y metabolismo de las hormonas esteroideas están implicadas en la respuesta a fármacos anti-TNF.
2. La presencia de las variantes genéticas en los genes *CYP1B1*, *CYP2C9*, *ESR1*, *ESR2*, *SHBG* y *FcγR3A* o sus haplotipos influyen en el riesgo de desarrollar erosiones óseas en los pacientes diagnosticados con AR y que su efecto puede depender de la presencia de FR.
3. La presencia de polimorfismos y/o haplotipos específicos en el gen *NFκB2* asocian con el riesgo de desarrollar AR en individuos con valores positivos de anti-CCP. Los polimorfismos en el locus *NFκB2* modulan la respuesta a fármacos anti-TNF, probablemente a través de la modulación de la IL10.
4. En este trabajo validamos en la población general y estratificada por FR la asociación de los locus *LINC02549* y *LRRC55* con la respuesta a fármacos inhibidores a TNF y proporciona nuevos conocimientos sobre el papel funcional de estos polimorfismos en la modulación de la respuesta inmunitaria y en la respuesta a fármacos anti-TNF.

Artículos



ARTÍCULOS Nº 1. Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients. Luz M. Canet, Jose M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Ana Rodríguez Ramos, Carmen B. Lupiañez, Helena Canhão, Manuel Martínez-Bueno, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Signe B Sorensen, Merete L Hetland, María José Soto-Pino, Miguel A. Ferrer, Antonio García, Bente Glintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Alfonso González-Utrilla, Miguel Ángel López Nevot, Pablo Conesa-Zamor, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Sven Erik Hobe Jacobsen, Eduardo Collantes-Estevez, Luca Quartuccio, Federico Canzian. João E. Fonseca, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen & Juan Sainz. *The Pharmacogenomics Journal*. Oct 2018. <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0057-x>.

Enlace PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287909/>

ARTÍCULOS Nº 2. Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REPAIR consortium. Jose M. Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Luz Canet¹, Rob ter Horst, Olivier Bakker, Alfons A. den Broeder, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhão, Ana Rodríguez-Ramos, Carmen B. Lupiañez, María José Soto-Pino, Antonio García, Eva Pérez-Pampin, Alfonso González-Utrilla, Alejandro Escudero, Juana Segura-Catena, Romana T. Netea-Maier, Miguel Ángel Ferrer, Eduardo Collantes-Estevez, Miguel Ángel López Nevot, Yang Li, Manuel Jurado, João E. Fonseca Mihai G. Netea, Marieke J. H. Coenen & Juan Sainz. *Scientific Report*. Sep 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51255-0>.

Enlace PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31616008/>

ARTÍCULO Nº 3. NFκB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium. Jose Manuel Sánchez-Maldonado, Manuel Martínez-Bueno, Helena Canhão, Rob ter Horst, Sonia Muñoz-Peña, Ana Moñiz-Díez, Ana Rodríguez-Ramos, Alejandro Escudero, Signe B. Sorensen, Merete L. Hetland, Miguel A. Ferrer, Bente Glintborg, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Antonio García, Alfons den Broeder, Salvatore De Vita, Svend Erik Hove Jacobsen, Eduardo Collantes, Luca Quartuccio, Mihai G. Netea, Yang Li, João E. Fonseca, Manuel Jurado, Miguel Ángel López-Nevot, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, Rafael Cáliz, & Juan Sainz. *Scientific Report*. March 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61331-5>.

Enlace PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32152480/>

ARTÍCULO Nº 4. Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts. José Manuel Sánchez-Maldonado, Rafael Cáliz, Miguel Ángel López-Nevot³, Antonio José Cabrera-Serrano, Ana Moñiz-Díez, Helena Canhão, Rob ter Horst, Luca Quartuccio, Signe B Sorensen, Bente Glintborg, Merete Lund Hetland, Ileana Filipescu, Eva Pérez-Pampin, Pablo Conesa-Zamora, Jerzy Swierkot, Alfons A den Broeder, Salvatore De Vita, Eva Rabing Brix Petersen, Yang Li, Miguel A. Ferrer, Alejandro Escudero, Mihai G. Netea, Marieke J. H. Coenen, Vibeke Andersen, João E. Fonseca, Manuel Jurado, Bogunia-Kubik K, Eduardo Collantes, Juan Sainz. *Frontiers in Immunology* 2021_En revision_.

1 **Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone**
2 **receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in**
3 **rheumatoid arthritis patients**
4
5

6 Luz M. Canet PhD¹, Jose M. Sánchez-Maldonado¹, Rafael Cáliz MD, PhD^{1,2}, Ana Rodríguez
7 Ramos¹, Carmen B. Lupiañez PhD¹, Helena Canhão MD, PhD³, Manuel Martínez-Bueno PhD⁴,
8 Alejandro Escudero MD, PhD⁵, Juana Segura-Catena¹, Signe B Sorensen PhD^{6,7}, Merete L Hetland
9 PhD^{6,7}, María José Soto-Pino², Miguel A. Ferrer MD, PhD², Antonio García MD, PhD², Bente
10 Glintborg PhD^{6,8}, Ileana Filipescu MD, PhD⁹, Eva Pérez-Pampin MD, PhD¹⁰, Alfonso González-Utrilla
11 MD, PhD², Miguel Ángel López Nevot MD, PhD¹¹, Pablo Conesa-Zamora PhD¹², Alfons den Broeder
12 PhD¹³, Salvatore De Vita MD, PhD¹⁴, Sven Erik Hobe Jacobsen PhD^{6,7}, Eduardo Collantes-Estevez
13 MD, PhD⁵, Luca Quartuccio MD, PhD¹⁴, Federico Canzian PhD¹⁵, João E. Fonseca MD, PhD^{16,17},
14 Marieke J. H. Coenen PhD¹³, Vibeke Andersen MD PhD^{18,19}, Juan Sainz PhD^{1,2}
15

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

19 ² Rheumatology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

20 ³ CEDOC, EpiDoC Unit, NOVA Medical School and National School of Public Health, Universidade Nova
21 de Lisboa, Lisbon, Portugal.

22 ⁴ Area of Genomic Medicine, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University
23 of Granada / Andalusian Regional Government, Granada, Spain

24 ⁵ Rheumatology department, Reina Sofía Hospital/IMIBIC/University of Córdoba, Córdoba, Spain

25 ⁶ The Danish Rheumatologic Biobank, the DANBIO registry and Copenhagen Center for Arthritis Research
26 (COPECARE), Center for Rheumatology and Spine Diseases, Centre of Head and Orthopaedics,
27 Rigshospitalet, Glostrup, Denmark

28 ⁷ Department of Clinical Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen,
29 Denmark

30 ⁸ Department of Rheumatology, Gentofte and Herlev Hospital, Copenhagen University Hospital,
31 Copenhagen, Denmark

32 ⁹ Rheumatology department, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca,
33 Romania

34 ¹⁰ Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

35 ¹¹ Immunology department. Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

36 ¹² Clinical Analysis department, Santa Lucía University Hospital, Cartagena, Spain

37 ¹³ Radboud university medical center, Radboud Institute for Health Sciences, Department of Human
38 Genetics, Nijmegen, The Netherlands.

39 ¹⁴ Department of Medical and Biological Sciences, Clinic of Rheumatology, University of Udine, Italy.

40 ¹⁵ Genomic Epidemiology Group, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

41 ¹⁶ Rheumatology and Metabolic Bone Diseases Department, Hospital de Santa Maria, CHLN, Lisbon,
42 Portugal

43 ¹⁷ Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon,
44 Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal

45 ¹⁸ Focused research unit for Molecular Diagnostic and Clinical Research, IRS-Center Sonderjylland,
46 Hospital of Southern Jutland, DK-6200 Aabenraa, Denmark

47 ¹⁹ Institute of Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense,
48 Denmark
49
50

51 Running title: Hormone-related variants and response to anti-TNF drugs

52 Key Words: Steroid hormone-related polymorphisms; genetic susceptibility; RA; anti-TNF drug
53 response; personalized medicine.
54
55
56

57

58

59 Corresponding author:

60 Juan Sainz, PhD

61 Genomic Oncology Area

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

63 Andalusian Regional Government

64 PTS Granada

65 Avda. de la Ilustración, 114

66 18016 Granada, Spain

67

68 Phone: +34-958-715500

69 Fax: +34-958-637071

70 E-mail: juan.sainz@genyo.es

71

72 Word Count: Abstract 257, Text 3526

73 Figures and Tables: 5 Tables, 3 Figures and 5 Supplementary Tables and 2 Supplementary Figures

74

75

76 **CONFLICT OF INTEREST**

77 VA has received compensation for consultancy and for being a member of an advisory board from

78 MSD (Merck) and Janssen. The rest of authors declare that they have no competing financial

79 interest.

80

81

82 **KEY MESSAGES**

83

84 • Polymorphisms within the *CYP3A4* and *CYP2C9* loci correlate with changes in DAS28 after
85 treatment with anti-TNF drugs.

86 • A haplotype including eQTL SNPs within the *ESR2* gene associates with better response to
87 anti-TNF drugs.

88 • A genetic model built with 8 steroid hormone-related variants significantly improved the ability
89 to predict drug response.

90 **ABSTRACT**

91 The aim of this case-control study was to evaluate whether 47 single nucleotide polymorphisms
92 (SNPs) in steroid hormone-related genes are associated with the risk of RA and anti-TNF drug
93 response. We conducted a case-control study in 3 European populations including 2936 RA
94 patients and 2197 healthy controls. Of those a total of 1985 RA patients were treated with anti-
95 TNF blockers. The association of potentially interesting markers in the discovery population was
96 validated through meta-analysis with data from DREAM and DANBIO registries.

97 Although none of the selected variants played a relevant role in modulating RA risk, the meta-
98 analysis of the linear regression data with those from the DREAM and DANBIO registries
99 showed a significant correlation of the *CYP3A4*_{rs11773597} and *CYP2C9*_{rs1799853} variants with
100 changes in DAS28 after the administration of anti-TNF drugs ($P=0.00074$, and $P=0.006$,
101 respectively). An overall haplotype analysis also showed that the *ESR2*_{GGG} haplotype
102 significantly associated with a reduced chance of having poor response to anti-TNF drugs
103 ($P=0.0009$). Finally, a ROC curve analysis confirmed that a model built with 8 steroid hormone-
104 related variants significantly improved the ability to predict drug response compared with the
105 reference model including demographic and clinical variables (AUC=0.633 vs. AUC=0.556;
106 $P_{LR_test}=1.52 \cdot 10^{-6}$).

107 These data together with those reporting that the *CYP3A4* and *ESR2* SNPs correlate with the
108 expression of *TRIM4* and *ESR2* mRNAs in PBMCs (ranging from $P=1.98 \cdot 10^{-6}$ to $P=2.0 \cdot 10^{-35}$)
109 and that the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP modulates the efficiency of multiple drugs, suggest that
110 steroid hormone-related genes may play a role in determining the response to anti-TNF drugs.

111

112

113

114

115

116 **Keywords:** Steroid hormone-related polymorphisms; genetic susceptibility; RA; anti-TNF drug
117 response; personalized medicine.

118 **INTRODUCTION**

119 Rheumatoid arthritis (RA) is an immune mediated chronic inflammatory disease characterized
120 by persistent inflammation of the synovial membrane that leads to progressive joint destruction,
121 bone erosion and damage in extra-articular tissues¹. Although the etiology of RA remains in part
122 unclear, there are evidences suggesting a role of sex steroid hormones in determining the onset
123 and progression of the disease². Women are more prone to have RA than men and show more
124 severe symptoms and faster disease progression³. It has been also reported that high female
125 sex hormone levels during pregnancy⁴ and estrogen replacement therapy or the use of oral
126 contraceptives may lead to a reduction in disease activity^{5, 6}. Experimental and human studies
127 have also demonstrated that steroid hormones may contribute to susceptibility to RA by
128 influencing both innate and adaptive immune responses^{2, 7}. In this regard, it has been described
129 that the administration of estrogens impairs the recruitment of antigen presenting cells and their
130 interaction with T-cells, thereby suppressing the production of pro-inflammatory cytokines⁸, and
131 inhibiting Th₁- and Th₁₇-mediated immune functions^{9, 10}. Estrogens stimulate Treg cell
132 development¹¹ and the release of anti-inflammatory cytokines (*IL10*, *IL4* and *TGFβ*)⁸ that may
133 result in the activation of Th₂-mediated immune responses. Recent studies have demonstrated
134 that these estrogen-mediated anti-inflammatory effects can be reversed by administration of
135 estrogen receptor blockers¹² suggesting a role of estrogens in the etiopathogenesis of RA and
136 response to therapies.

137

138 Despite this suggestive background, it is still not clear whether single nucleotide polymorphisms
139 (SNPs) within steroid hormone-related pathways may confer susceptibility to RA¹³⁻¹⁵ and affect
140 drug response¹⁶. Hence, we conducted a case-control study to investigate whether 47
141 potentially functional SNPs in 16 steroid hormone-related genes are associated with the risk of
142 RA and response to anti-TNF drugs. In addition, we investigated whether these variants could
143 be useful to improve the prediction of TNF blocker response.

144

145

146 **MATERIAL AND METHODS**

147 *Discovery population*

148 This study included 2 stages (Figure 1). The discovery population consisted of 1359 RA patients
149 and 1219 controls (Supplementary Table 1 and Supplementary Material). The study complied
150 with Declaration of Helsinki. All participants were Caucasian and gave their written informed
151 consent to participate in the study, which was approved by the ethical review committee of
152 participant institutions. RA patients fulfilled the 1987 revised American College of Rheumatology
153 (ACR)¹⁷ and the ACR/EULAR 2010 classification criteria¹⁸. A detailed description of this cohort
154 has been reported elsewhere^{19,20}.

155

156 *Response to anti-TNF medications*

157 Disease activity scores (DAS28) at baseline and at 6 months after treatment with anti-TNF
158 drugs were available in a subset of 548 RA patients from the discovery population. Only those
159 patients with a follow-up of at least 6 months after introduction of the first anti-TNF treatment
160 were included in the study and those with missing values for DAS28 in the selected time points
161 were excluded.

162

163 *SNP selection and genotyping*

164 Considering the existing data in the literature suggesting a role of steroid hormones in RA onset
165 and disease progression, we selected potentially functional SNPs within hormone-related genes
166 that might affect the risk of developing RA and drug response. SNPs within these genes were
167 then selected according to their potential functionality and linkage disequilibrium (LD). This
168 selection strategy ended up with a selection of 47 variants (Table 1) that were genotyped in the
169 discovery population (Table 2 and Supplementary Table 2). Genomic DNA was extracted from
170 peripheral blood using the Qiagen Mini Kit (Qiagen, CA, USA). Genotyping was carried out
171 using KASPar® assays (LGC Genomics, London, UK) in a 384-well plate format (Applied
172 Biosystems, CA, USA) according to manufacture's instructions (Supplementary Material).

173

174 *Statistical analysis*

175 The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test was performed in the control group by a standard
176 observed-expected chi-square (χ^2). Linear and logistic regression analyses adjusted for age,
177 sex and country of origin were used to assess the main effects of the selected SNPs on RA risk
178 and drug response. Statistical power was estimated using Quanto (<http://hydra.usc.edu/gxe/>).

179

180 Correction for multiple testing was performed using the Meff method for SNPs genotyped across
181 all populations²¹ but also considering the number of inheritance models tested (dominant,
182 recessive and log-additive). The threshold used for the risk and drug response analyses was
183 0.0011 ([0.05]/16 independent markers genotyped across different populations)/3 models).

184

185 *Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis*

186 We performed haplotype frequency estimation and haplotype association analysis adjusted for
187 age, sex and country of origin using SNPstats²² and haplogit package in STATA. Haplotype
188 frequencies were determined using the Expectation-maximization (EM) algorithm. Haplotypes
189 were reconstructed using SNPtool and Haploview and block structures were determined
190 according to the method of Gabriel *et al.*²³.

191

192 *Replication populations and meta-analyses*

193 For replication purposes, we used genetic data from a genome-wide association study (GWAS)
194 on drug response conducted in 882 Dutch RA patients from the DREAM (Dutch Rheumatoid
195 Arthritis Monitoring) registry. Given that part of the SNPs included in the GWAS were imputed,
196 we decided to genotype those imputed SNPs that showed significant or potentially interesting
197 results in a subset of 708 patients with DNA available. Then, we advanced for replication in a
198 third population of 695 Danish RA patients (555 treated with anti-TNF drugs) and 978 healthy
199 controls ascertained through the DANBIO registry (The National Danish Registry for Biological
200 Treatment of Rheumatic Diseases) those SNPs that reported promising results on RA risk and
201 drug response either in the discovery and/or Dutch cohorts (Supplementary Table 1). Additional

202 SNPs were genotyped to facilitate the reconstruction of haplotypes for risk and drug response
203 analyses. Demographic and clinical details of the replication cohorts including patients treated
204 with anti-TNF blockers are included in Supplementary Table 2. The study was approved by the
205 Institutional review board of the Radboud University Medical Center and by the Regional Ethics
206 Committee of Central Denmark Region (M-20100153 and S-20120113). All patients provided
207 written informed consent and clinical information was prospectively gathered from the medical
208 records.

209

210 To test for genetic association, we conducted a meta-analysis of the discovery data with those
211 from the 2 European registries and the I^2 statistic was used to assess statistical heterogeneity
212 between studies. The pooled OR was computed using the random-effect model.

213

214 *Population admixture*

215 Given the multicenter nature of our study, we evaluated whether the association estimates for
216 those SNPs with significant effects on risk or drug response changed across different countries.
217 We performed a meta-analysis by country assuming a dominant model of inheritance and a
218 random-effect model. I^2 statistic was used to assess heterogeneity.

219

220 *eQTL and in silico functional analysis*

221 We also assessed whether any of the polymorphisms associated with RA risk or drug response
222 correlated with mRNA expression levels in the publicly available eQTL browsers for PBMCs
223 (www.genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/ and www.gtexportal.org/home/), or tissues
224 (www.sanger.ac.uk/science/tools/genevar-gene-expression-variation-archive). Haploreg
225 (www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php) and ENCODE annotation data
226 (www.genome.ucsc.edu/ENCODE/) were used to predict the functional role of those SNPs
227 considered of interest.

228

229 *Predictive models and discriminative accuracy*

230 The value of steroid hormone-related variants for prediction of anti-TNF drug response was
231 assessed using stepwise logistic regression analyses (Supplementary Material). A model was
232 built including age, sex, RF and genetic polymorphisms that showed significant associations
233 with response to anti-TNF drugs in the single-SNP or haplotype analyses ($P<0.05$). This model
234 was compared with a reference model including demographic and clinical variables. The area
235 under the curve (AUC) of a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and a -2 log
236 likelihood ratio (LR) test were used to assess whether the genetic model fitted significantly
237 better the data compared to the reference model. Finally, we run a randomization test to confirm
238 whether the improved predictive ability of the genetic model was consistent after 50.000
239 iterations (Supplementary Material). All tests were conducted using R software ([http://www.r-](http://www.r-project.org/)
240 [project.org/](http://www.r-project.org/)).

241

242 **RESULTS**

243 *Characteristics of study subjects*

244 A total of 2936 RA patients and 2197 controls were included in this study. RA patients were
245 older than controls (57.10 ± 13.36 vs. 50.01 ± 12.16 ; $P<0.05$) and showed a significantly higher
246 female/male ratio (3.10 vs. 1.03, respectively; $P<0.001$). A total of 1985 RA patients received
247 anti-TNF therapy. Demographic and clinical characteristics of RA patients and those treated
248 with anti-TNF drugs are displayed in Table 2 and Supplementary Table 2.

249

250 *Association analysis in the discovery and replication populations*

251 All SNPs were in Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) in the control group ($P<0.001$). The meta-
252 analysis of our discovery population data with those from the DANBIO registry showed that
253 none of the selected SNPs or haplotypes remained significantly associated with RA risk after
254 correction for multiple testing (Supplementary Table 3 and 4 and Supplementary Material). We
255 then explored whether selected polymorphisms had a role in modulating the response to anti-
256 TNF medications. Linear regression analyses in the discovery population showed that the
257 *CYP3A4*_{rs11773597C}, *CYP1A1*_{rs1799814A}, *CYP1B1*_{rs1056836C}, *GSTP1*_{rs1695G} and *GSTP1*_{rs1138272T} alleles

258 showed a positive correlation with changes in DAS28 (per-allele OR=1.43, 1.66, 1.34, 1.22 and
259 1.55) whereas the *PGR*_{rs518162A} and *SULT1A1*_{rs9282861A} alleles showed a significant but opposite
260 effect (per-allele OR=0.74 and 0.80, respectively; Table 3). Importantly, the meta-analysis of
261 these data with those from the DREAM and DANBIO registries including 1985 anti-TNF patients
262 confirmed that each copy of the *CYP3A4*_{rs11773597C} allele significantly increased the chance of
263 having a large decrease in the DAS28 after the treatment with anti-TNF medications (per-allele
264 OR=1.36, $P=0.00074$, $P_{\text{Het}}=0.28$; Table 3 and Figure 2). The association of this SNP with drug
265 response remained significant after correction for multiple testing. Furthermore, although it only
266 remained marginally associated, the meta-analysis confirmed that the *CYP2C9*_{rs1799853T} allele
267 inversely correlated with changes in DAS28 (OR=0.81, $P=0.006$, $P_{\text{Het}}=0.686$; Table 3 and Figure
268 2). In line with these findings, we found that the *CYP3A4*_{rs11773597C} allele strongly correlates with
269 *TRIM4* mRNA expression levels in PBMCs ($P=2.01 \cdot 10^{-35}$, Z-score=12.42), which is a key gene
270 implicated in the regulation of steroid hormone levels but also in the control of important immune
271 pathways in RA such as NF κ B and IFN γ . In addition to these evidences, we found that this SNP
272 maps among enhancer histone marks in 5 tissues including the skeletal muscle and conjunctive
273 systems, which suggests that this SNP might be also involved in the modulation of epigenetic
274 changes and gene transcription in these tissues. On the other hand, it is conceivable to suggest
275 a role of the missense *CYP2C9*_{rs1799853} SNP in the modulation of the response to anti-TNF
276 drugs. The *CYP2C9*_{rs1799853} variant has been consistently identified as a poor metabolizer for a
277 wide range of drugs and it modulates *MAFK* mRNA expression levels ($P=1.0 \cdot 10^{-31}$), which is a
278 gene consistently implicated in pharmacodynamics.

279

280 *Haplotype analysis*

281 Based on these findings, we also investigated whether specific haplotypes within estrogen-
282 related genes might influence the response to anti-TNF medications when EULAR response
283 criteria were assumed. Haplotype association analysis was adjusted for age, sex and country of
284 origin considering and considered independent markers for each locus ($r^2 < 0.80$; Supplementary
285 Figure 1). Interestingly, we found a significant association of the *ESR2*_{G66} haplotype (including

286 eQTL alleles) with a decreased chance of having poor response to anti-TNF drugs. Importantly,
287 this association survived correction for multiple testing (OR=0.64, $P=0.0009$; Table 4).
288 Haplotype analysis also showed that the $GSTP1_{GT}$ haplotype was weakly associated with a
289 decreased risk of having poor response (OR=0.70, $P=0.012$). Given the lack of association with
290 changes in DAS28 for SNPs within *ESR2* and *GSTP1* genes in the single-SNP analysis, these
291 results suggested that the effect of these loci on drug response might be due to haplotypes
292 rather than specific SNPs. In support of this notion, we found that the $ESR2_{rs928554}$, $ESR2_{rs4986938}$
293 and $ESR2_{rs1255998}$ SNPs strongly correlated with *ESR2* mRNA expression levels in whole blood
294 and/or a lymphoblastoid cell lines (from $P=2.55\cdot 10^{-2}$ to $P=2.82\cdot 10^{-26}$, Supplementary Figure 2)
295 but also in certain tissues ($P=3.858\cdot 10^{-8}$) whereas the presence of the $GSTP1_{rs1695}$ SNP
296 correlated with *GSTP1* mRNA expression levels in blood mononuclear cells ($P=5.58\cdot 10^{-16}$) and
297 a wide variety of tissues (from $P=9.73\cdot 10^{-6}$ to $P=8.06\cdot 10^{-9}$). Likewise, we found that the
298 $GSTP1_{rs1695}$ SNP mapped among promoter and enhancer histone marks in many cell types and
299 tissues and changed binding motifs for POL2, CTCF, MAX and USF1. These results suggest
300 that the *ESR2* and *GSTP1* loci might represent expression quantitative trait loci (eQTL) for drug
301 response to anti-TNF medications in RA. Although our results point out the importance of the
302 *ESR2* locus in the modulation of drug response to anti-TNF blockers, the effect of the *GSTP1*
303 gene on drug response need to be confirmed. No significant heterogeneity or population
304 admixture was detected in our study (Supplementary Table 5), which confirmed the consistency
305 of our results.

306

307 *Predictive analysis: ROC curve*

308 Finally, we analyzed whether those SNPs that were associated with response to anti-TNF could
309 be useful to predict the response to anti-TNF drugs. To do that, we performed stepwise
310 regression and ROC curve analyses resulting in a model including 8 variants that together with
311 demographic (age and sex) and clinical (RF) variables significantly improved the ability to
312 predict the response to anti-TNF medications compared with the reference model including
313 demographic information (AUC=0.633, 95%CI 0.60-0.67 vs. AUC=0.556, 95%CI 0.52-0.59; P_{LR}

314 $t_{\text{est}}=1.52 \cdot 10^{-7}$; Table 5 and Figure 3). The consistency of this predictive analysis was confirmed
315 through a permutation test that showed that none of the 50.000 permuted models showed a
316 better prediction capacity than the genetic model (Average sorted AUC=0.5752, Z-score=6.35
317 and $P_{Z_score(50.000\text{perm})}=1.06 \cdot 10^{-10}$; Table 5 and Supplementary material).

318

319 **DISCUSSION**

320 Data from this large case-control study showed that none of the selected steroid hormone-
321 related SNPs was consistently associated with RA risk. However, we observed that the *CYP3A4*
322 locus was involved in the modulation of the response to anti-TNF therapies. The meta-analysis
323 of the data obtained in discovery population with those from the DREAM and DANBIO registries
324 showed that carriers of the *CYP3A4*_{rs11773597C} allele had a significantly larger decrease in DAS28
325 after the treatment with anti-TNF drugs compared with patients carrying the GG genotype.
326 Importantly, the association of the *CYP3A4*_{rs11773597} SNP with a better response to anti-TNF
327 drugs survived correction for multiple testing suggesting a key role of the *CYP3A4* locus in the
328 modulation of the response to anti-TNF medications.

329

330 *CYP3A4* gene is clustered along with other *CYP3A* genes (*CYP3A5*, *CYP3A7* and *CYP3A43*) in
331 a short region of 0.2 Mb on the chromosome 7q21 and encodes one of the most abundant
332 enzymes catalyzing the oxidation of endogenous and exogenous sex steroid hormones but also
333 the metabolism of a broad variety of drugs^{24, 25}. Considering our data, we hypothesize that the
334 *CYP3A4*_{rs11773597} polymorphism within the 5'-UTR region of the *CYP3A4* gene or a specific
335 haplotype including this variant might regulate directly or indirectly the expression of the
336 *CYP3A4* mRNA and, therefore, influence the response to anti-TNF drugs through the
337 modulation of steroid hormone metabolite levels and, consequently, certain immune-related
338 pathways. In support of this hypothesis, we found that the presence of the *CYP3A4*_{rs11773597C}
339 allele strongly correlated with higher *TRIM4* mRNA expression levels, which is a gene recently
340 identified in a GWAS as a factor regulating steroid hormone levels²⁶. In addition, several
341 experimental studies have demonstrated that the overexpression of *TRIM4* mRNA induces the

342 activation of the NFκB and IFNγ pathways²⁷ and the release of pro-inflammatory mediators (IL6,
343 TNF, IFNG, and IL1)^{28, 29}, which in turn affect *CYP3A4* mRNA and protein expression levels.
344 However, although tempting, we cannot ensure that the *CYP3A4*_{rs11773597} SNP is a causative
345 variant and, therefore, we believe that fine mapping of this region along with a better
346 characterization of the functional impact of the *CYP3A4* variants or haplotypes on drug
347 response is needed to identify the causative variant/s underlying the observed effect.

348

349 Another interesting result in this study was the association of SNPs within *ESR2* and *CYP2C9*
350 genes with response to anti-TNF drugs. The most relevant effect was found for the *ESR2*_{GGG}
351 haplotype that was associated with a decreased chance of having poor response to anti-TNF
352 drugs. The association of this haplotype with drug response remained significant even after
353 correction for multiple testing, which supported our hypothesis (but also the one from many
354 other epidemiological and experimental studies) suggesting a key role of the estrogen signalling
355 in determining disease progression in RA. These results along with those reporting a strong
356 correlation of the *ESR2* 3'-UTR polymorphisms with *ESR2* mRNA expression³⁰ emphasizes the
357 involvement of *ESR2* locus in determining the response to anti-TNF drugs likely through the
358 modulation of estrogen-dependent immune responses.

359

360 *ESR2* gene is located on chromosome 14q23.2 and encodes the estrogen receptor beta (ESRβ)
361 that is highly expressed in synovial cells³¹ and bone³² but also in most of the immune cells³³. A
362 number of observational studies have suggested that estrogens are joint protective and that its
363 excess contributes to maintain bone density³⁴ and protects against RA^{4, 35}. Likewise, it has been
364 reported that withdrawal of estrogens increases the incidence of RA³⁶ and its severity³⁷. Several
365 experimental studies have demonstrated that estrogens are involved in controlling both Th₁- and
366 Th₂-mediated immune responses in RA either directly through estrogen response elements
367 (EREs) or indirectly through interaction of *ESR2* with other transcription factors such as NFκB
368 and AP1³⁸. Furthermore, it has been reported that estrogens are implicated in the modulation of

369 a wide variety of immune mechanisms including thymocyte maturation³⁹, cell trafficking⁴⁰, B and
370 T cell proliferation⁴¹ and expression of specific adhesion molecules⁴¹ through ESR-dependent
371 pathways. There has been described that estrogens are also able to stimulate B cell activity by
372 suppressing T cell-mediated immune responses and inhibiting autoreactive B-cell apoptosis⁴²
373 but also the promotion of Th2-mediated immune responses⁴³ and the inhibition of Th₁₇ cells⁴⁴,
374 which are key players in determining both systemic and tissue-specific autoimmunity. Previous
375 animal studies have demonstrated that ovariectomized mice have increased incidence and
376 severity of collagen-induced arthritis and that the administration of exogenous estrogen or
377 progesterone quickly induces disease attenuation by reducing the number of IL17-producing
378 cells and neutrophils in joints⁴⁴. With this background, it seems to be plausible to hypothesize
379 that polymorphisms within the *ESR2* locus may contribute to modulate the effect of estrogens
380 on the immune system and thereby influencing the response to anti-TNF drugs and disease
381 severity.

382

383 On the other hand, this study confirmed that the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP negatively impacted on
384 the response to anti-TNF drugs. Each additional copy of the *CYP2C9*_{rs1799853T} allele decreased
385 the odds of having a significant drop in the DAS28 after the treatment with anti-TNF
386 medications. *CYP2C9* is one of the genes clustered in a small region (~500 kb) on the 10q24
387 and it catalyzes detoxification of many carcinogens and hydroxylation of wide range of drugs
388 including anti-estrogen drugs⁴⁵. The *CYP2C9*_{rs1799853} SNP is an exonic variant that alters the
389 amino acid sequence (Arg144Cys) and appears to decrease the activity of the enzyme and,
390 consequently, the metabolism of certain drugs⁴⁶. According to most *in-vitro* data, our results
391 suggested that patients carrying the *CYP2C9*_{rs1799853T} allele (that acts as poor metabolizer) had
392 an increased chance of having poor response to anti-TNF drugs. Although the association of
393 this marker with response to anti-TNF drugs did not reach statistical significance after correction
394 for multiple testing, it seems plausible to suggest that this marker might also influence the
395 metabolism of anti-TNF blockers and, consequently, affect the efficiency of these biologic drugs
396 for the treatment of RA. Considering that this is the first study showing a link between the

397 *CYP2C9* locus and drug response to anti-TNF drugs, we think that it would worth to conduct
398 additional studies to confirm our results and to assess whether the effect of the *CYP2C9* gene
399 on drug response is directly due to defects in the metabolism of anti-TNF drugs or whether,
400 alternatively, its effect is mediated by alterations in the metabolism of steroid hormones.

401

402 Although this large study had a sufficient power (80%) to detect associations with an OR of 1.21
403 or 1.57 for a genetic variant with a MAF of 0.25 in the risk and drug response analyses, we
404 recognize that the relatively modest effect found for *CYP3A4*, *CYP2C9* and *ESR2* variants
405 might be due to limited population sizes. With the aim of further testing the role of these loci on
406 response to anti-TNF medications, we compared the prediction ability of a model including
407 SNPs significantly associated with drug response with a reference model including demographic
408 and clinical covariates. Our results showed that the addition of 8 SNPs within the *CYP3A4*,
409 *ESR2* and *CYP2C9* but also *GSTP1*, *ESR1* and *NR1I2* genes to the reference model showed a
410 substantially improved ability to predict the response to anti-TNF drugs. The AUC for the genetic
411 model was ~7% higher in comparison with the AUC of the reference model, emphasizing the
412 importance of considering polymorphisms in phase I- and II-metabolizing enzyme and hormone
413 receptor genes to predict the response to anti-TNF medications. Given the lack of precise
414 clinical markers to foresee the response to anti-TNF medications⁴⁷, the modest predictive value
415 of these SNPs, if validated, along with those SNPs identified at genome-wide level⁴⁸⁻⁵³ might be
416 useful for patient stratification and to identify personalized treatment and follow up strategies for
417 RA patients. However, at this point, it is necessary to remark that a predictive model that
418 increases only 7% our chance to predict response to TNF blockers is still far away from being
419 applicable in a clinical context. Additional studies using additional markers and larger and well-
420 characterized populations are now warranted to improve predictive models for drug response.

421

422 **CONCLUSIONS**

423 These results suggest that genetic variants within steroid hormone-related genes influence the
424 response to anti-TNF medications and that genotyping of specific polymorphisms in these

425 genes can be used to improve the prediction of drug response and to contribute to patient risk
426 stratification.

427

428 **CONFLICT OF INTEREST**

429 VA has received compensation for consultancy and for being a member of an advisory board
430 from MSD (Merck) and Janssen. The rest of authors declare that they have no competing
431 financial interests.

432

433 **FUNDING**

434 This work was supported by grants from FIBAO foundation (Granada, Spain); Novo Nordisk
435 Fonden (NNF15OC0016932); Knud og Edith Eriksens Mindefond and Gigtforeningen (A2037,
436 A3570).

437

438 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

439 RC and JS designed the study and drafted the manuscript. LMC, ARR, JMSM and CBL were
440 responsible for genotyping. MM-B, FC and JS did the statistical data analysis, HC, AE, JSC, SS,
441 MLH, MJSP, MAF, AG, BG, IF, EPP, AGU, MALN, PCZ, AdB, SdV, SEHJ, ECE, LQ, JEF,
442 MJHC, VA and JS coordinated the sample collection and HC, IF and MJSP were involved in the
443 records review and data acquisition. All authors contributed to, seen, and approved the final
444 version of the manuscript.

445

446 **ACKNOWLEDGMENTS**

447 We thank all participants who have agreed to participate in this study. Authors also thank María
448 Dolores Casares, Ángeles Molina, Carmen Oloriz for the collection of Spanish samples and
449 Hans Jurgen Hoffmann, Marianne Thomsen, Vibeke Østergaard Thomsen, Malene Rohr
450 Andersen, Lise Lotte B. Laursen, Helle Jørgensen, Ram Benny Christian Dessau, Niels Steen
451 Krogh, Ulla Vogel, Paal Skytt Andersen, Ivan Brandslund, Steffen Bank, Frederik Trier Møller,
452 Nikolai Toft and Niels Møller Andersen for the participation in collection and purification of

453 Danish samples.

454

455 **REFERENCES**

456 1. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid
457 arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun* 2012; **39**(3):
458 222-228.

459 2. Hughes GC, Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and
460 progesterone. *Nat Rev Rheumatol* 2014; **10**(12): 740-751.

461 3. Kvien TK, Uhlig T, Odegard S, Heiberg MS. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis:
462 the sex ratio. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1069**: 212-222.

463 4. Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman AJ. Does rheumatoid arthritis remit during
464 pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the United Kingdom
465 performed prospectively from late pregnancy. *Arthritis Rheum* 1999; **42**(6): 1219-1227.

466 5. Salliot C, Bombardier C, Saraux A, Combe B, Dougados M. Hormonal replacement therapy
467 may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry HLA-DRB1 *01 and/or
468 *04 alleles by protecting against the production of anti-CCP: results from the ESPOIR
469 cohort. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**(9): 1683-1686.

470 6. Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. The effect of oral contraceptives and
471 estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study.
472 *J Rheumatol* 2004; **31**(2): 207-213.

473 7. Yamasaki D, Enokida M, Okano T, Hagino H, Teshima R. Effects of ovariectomy and
474 estrogen replacement therapy on arthritis and bone mineral density in rats with collagen-
475 induced arthritis. *Bone* 2001; **28**(6): 634-640.

476 8. Salem ML. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated
477 inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets*
478 *Inflamm Allergy* 2004; **3**(1): 97-104.

479

- 480 9. Luo CY, Wang L, Sun C, Li DJ. Estrogen enhances the functions of
481 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and
482 bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* 2011; **8**(1): 50-58.
- 483 10. Lelu K, Laffont S, Delpy L, Paulet PE, Perinat T, Tschanz SA, *et al.* Estrogen receptor alpha
484 signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell
485 differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J*
486 *Immunol* 2011; **187**(5): 2386-2393.
- 487 11. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, *et al.* Induction of regulatory T cells by
488 physiological level estrogen. *J Cell Physiol* 2008; **214**(2): 456-464.
- 489 12. Dulos J, Vijn P, van Doorn C, Hofstra CL, Veening-Griffioen D, de Graaf J, *et al.*
490 Suppression of the inflammatory response in experimental arthritis is mediated via estrogen
491 receptor alpha but not estrogen receptor beta. *Arthritis Res Ther* 2010; **12**(3): R101.
- 492 13. Sato H, Ito A, Gonzalez-Canga A, Okuzawa H, Ugai K, Suzuki M, *et al.* Association of Rsa
493 polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*
494 2012; **32**(7): 2143-2148.
- 495 14. Dziedziejko V, Kurzawski M, Safranow K, Drozdziak M, Chlubek D, Pawlik A. Oestrogen
496 receptor polymorphisms in female patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*
497 2011; **40**(5): 329-333.
- 498 15. Karlson EW, Chibnik LB, McGrath M, Chang SC, Keenan BT, Costenbader KH, *et al.* A
499 prospective study of androgen levels, hormone-related genes and risk of rheumatoid
500 arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**(3): R97.
- 501 16. Pawlik A, Dziedziejko V, Kurzawski M, Safranow K, Kotrych D, Bohatyrewicz A. Effect of
502 ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate.
503 *Pharmacol Rep* 2012; **64**(1): 185-190.
- 504 17. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al.* The
505 American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid
506 arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; **31**(3): 315-324.
- 507

- 508 18. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL.
509 Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria
510 for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of
511 Rheumatology and the World Health Organization/International League Against
512 Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996; **39**(1): 34-40.
- 513 19. Canet LM, Filipescu I, Cáliz R, Lupiañez CB, Canhão H, Escudero A, *et al.* Genetic variants
514 within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-
515 TNF drugs: a multicenter study. *Pharmacogenet Genomics* 2015; **25**(9): 432-443.
- 516 20. Canet LM, Cáliz R, Lupiañez CB, Canhão H, Martinez M, Escudero A, *et al.* Genetic
517 variants within immune-modulating genes influence the risk of developing rheumatoid
518 arthritis and anti-TNF drug response: a two-stage case-control study. *Pharmacogenet*
519 *Genomics* 2015; **25**(9): 432-443.
- 520 21. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in
521 linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004; **74**(4): 765-769.
- 522 22. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of
523 association studies. *Bioinformatics* 2006; **22**(15): 1928-1929.
- 524 23. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, *et al.* The structure
525 of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; **296**(5576): 2225-2229.
- 526 24. Niwa T, Yabusaki Y, Honma K, Matsuo N, Tatsuta K, Ishibashi F, *et al.* Contribution of
527 human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid
528 hormones. *Xenobiotica* 1998; **28**(6): 539-547.
- 529 25. Boullata JI, Armenti VT. *Handbook of drug-nutrient interactions*. Humana Press: Totowa,
530 N.J., 2004, xvii, 563 p.pp.
- 531 26. Zhai G, Teumer A, Stolk L, Perry JR, Vandenput L, Coviello AD, *et al.* Eight common
532 genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing
533 mechanisms. *PLoS Genet* 2011; **7**(4): e1002025.

- 534 27. Yan J, Li Q, Mao AP, Hu MM, Shu HB. TRIM4 modulates type I interferon induction and
535 cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination. *J Mol Cell Biol*
536 2014; **6**(2): 154-163.
- 537 28. Liptrott NJ, Penny M, Bray PG, Sathish J, Khoo SH, Back DJ, *et al.* The impact of cytokines
538 on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine
539 receptors in human PBMC. *Br J Pharmacol* 2009; **156**(3): 497-508.
- 540 29. Mimura H, Kobayashi K, Xu L, Hashimoto M, Ejiri Y, Hosoda M, *et al.* Effects of cytokines
541 on CYP3A4 expression and reversal of the effects by anti-cytokine agents in the three-
542 dimensionally cultured human hepatoma cell line FLC-4. *Drug Metab Pharmacokinet* 2015;
543 **30**(1): 105-110.
- 544 30. Lappalainen T, Sammeth M, Friedlander MR, t Hoen PA, Monlong J, Rivas MA, *et al.*
545 Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*
546 2013; **501**(7468): 506-511.
- 547 31. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Coviello DA, *et al.* Androgen and
548 estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin*
549 *Endocrinol Metab* 1996; **81**(2): 820-827.
- 550 32. Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are
551 differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(5):
552 2309-2314.
- 553 33. Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Clerico P, Bagnasco M, Coviello DA, *et al.* Presence of
554 estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ T
555 lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993; **36**(8): 1087-1097.
- 556 34. Recker RR, Davies KM, Dowd RM, Heaney RP. The effect of low-dose continuous estrogen
557 and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in elderly women. A
558 randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; **130**(11): 897-904.
- 559 35. Ostensen M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus
560 erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **876**: 131-143; discussion 144.
- 561

- 562 36. Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, De Keyser F, Van der Straeten C, Verbruggen G,
563 *et al.* Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal
564 transition. *J Rheumatol* 1990; **17**(12): 1620-1622.
- 565 37. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL. Influence of
566 sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*
567 2001; **28**(8): 1809-1816.
- 568 38. Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell*
569 *Immunol* 2015; **294**(2): 63-69.
- 570 39. Erlandsson MC, Ohlsson C, Gustafsson JA, Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha
571 and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus.
572 *Immunology* 2001; **103**(1): 17-25.
- 573 40. Mo R, Chen J, Grolleau-Julius A, Murphy HS, Richardson BC, Yung RL. Estrogen regulates
574 CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J Immunol* 2005; **174**(10): 6023-
575 6029.
- 576 41. Da Silva JA. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann*
577 *N Y Acad Sci* 1999; **876**: 102-117; discussion 117-108.
- 578 42. Medina KL, Strasser A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation,
579 and survival of early B-lineage precursors. *Blood* 2000; **95**(6): 2059-2067.
- 580 43. Beagley KW, Gockel CM. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex
581 hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **38**(1): 13-22.
- 582 44. Andersson A, Stubelius A, Karlsson MN, Engdahl C, Erlandsson M, Grahne L, *et al.*
583 Estrogen regulates T helper 17 phenotype and localization in experimental autoimmune
584 arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; **17**(1): 32.
- 585 45. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, *et al.* Cytochrome
586 P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* 2010; **20**(4): 277-281.
- 587 46. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, *et al.*
588 The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism.
589 *Pharmacogenetics* 1996; **6**(4): 341-349.

- 590 47. Cuppen BV, Welsing PM, Sprengers JJ, Bijlsma JW, Marijnissen AC, van Laar JM, *et al.*
591 Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis: a systematic review with a focus
592 on clinical applicability. *Rheumatology (Oxford)* 2016; **55**(5): 826-839.
- 593 48. Liu C, Batliwalla F, Li W, Lee A, Roubenoff R, Beckman E, *et al.* Genome-wide association
594 scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF
595 treatment in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2008; **14**(9-10): 575-581.
- 596 49. Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, *et al.*
597 GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1 with anti-TNF
598 therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2013; **14**(7): 727-734.
- 599 50. Plant D, Prajapati R, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD, *et al.* Replication of
600 association of the PTPRC gene with response to anti-tumor necrosis factor therapy in a
601 large UK cohort. *Arthritis Rheum* 2012; **64**(3): 665-670.
- 602 51. Cui J, Saevarsdottir S, Thomson B, Padyukov L, van der Helm-van Mil AH, Nititham J, *et al.*
603 Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to anti-tumor
604 necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum* 2010; **62**(7): 1849-1861.
- 605 52. Plant D, Bowes J, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, *et al.* Genome-wide
606 association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in
607 rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci. *Arthritis*
608 *Rheum* 2011; **63**(3): 645-653.
- 609 53. Umicevic Mirkov M, Cui J, Vermeulen SH, Stahl EA, Toonen EJ, Makkinje RR, *et al.*
610 Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid
611 arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**(8): 1375-1381.
- 612
613
614
615
616
617

618 **FIGURE LEGENDS**

619 **Figure 1.** Summary of the overall study design and workflow for meta-analyses.

620

621 **Figure 2.** Meta-analyses of the association of the *CYP3A4* and *CYP2C9* polymorphisms with
622 response to anti-TNF drugs.

623

624 Meta-analyses assuming a random-effect model.

625

626 **Figure 3.** Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis.

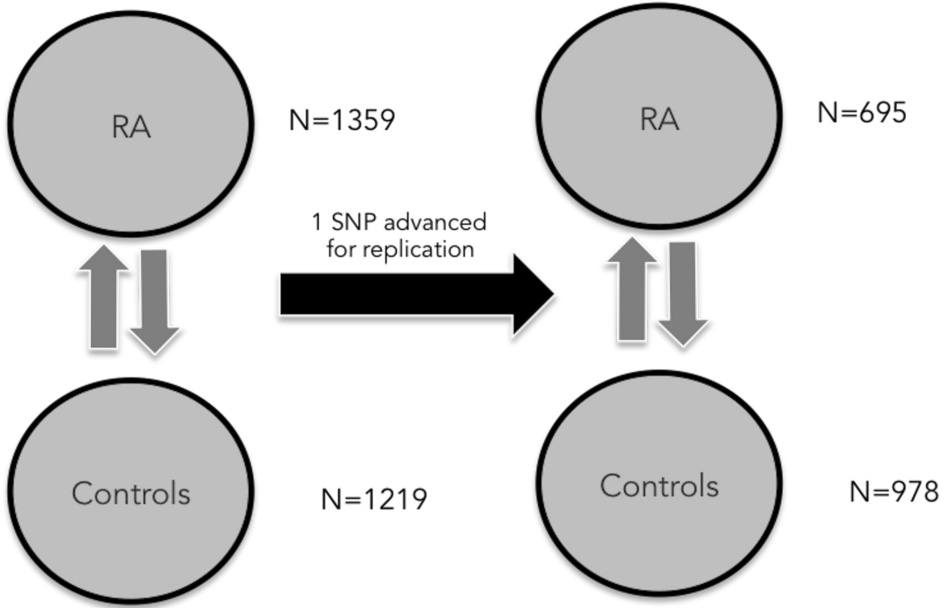
627 ROC curves summarize the accuracy of prediction for each particular model. The model including SNPs
628 significantly associated with response to anti-TNF drugs (either in the single-SNP or haplotype analyses) and
629 demographic and clinical variables (marked in blue) showed a significantly improved predictive capacity
630 compared with a reference model including only age, gender and RF as covariates (marked in red).
631 AUC=0.633 vs. AUC=0.556; N=1032.

632

RISK ANALYSIS (n=2578)

STAGE I: Discovery population

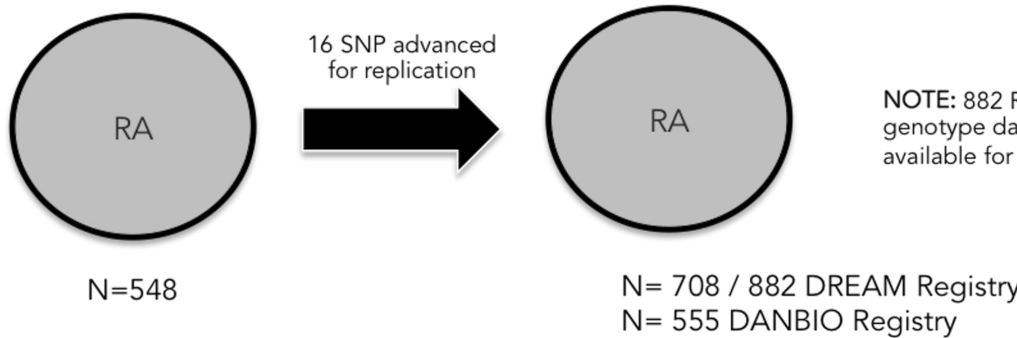
STAGE II: Replication in DANBIO registry



DRUG RESPONSE ANALYSIS (n=1985)

STAGE I: Discovery population

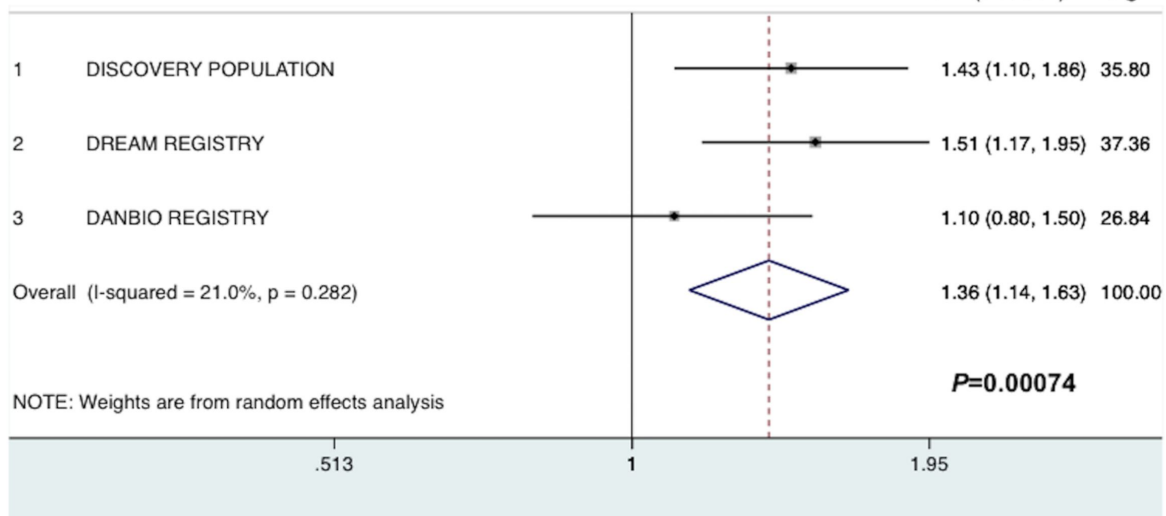
STAGE II: Replication in DREAM and DANBIO registries



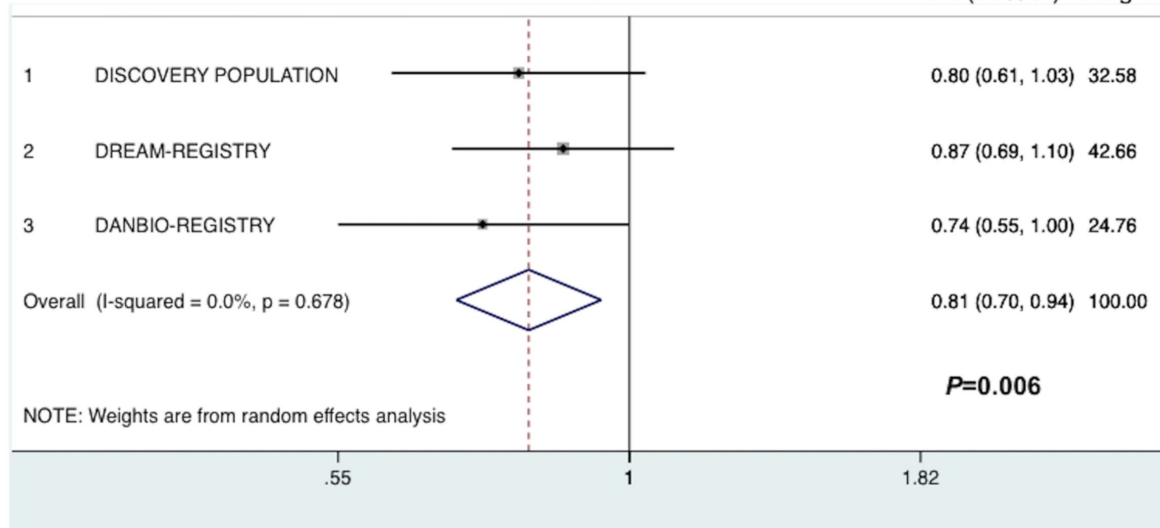
NOTE: 882 RA patients were considered for SNPs with genotype data in the GWAS and 708 RA patients were available for genotyping of imputed SNPs.

META-ANALYSIS OF LINEAR REGRESSION DATA (Δ DAS28)

CYP3A4_rs11773597 (Additive model)



CYP2C9_rs1799853 (Additive model)



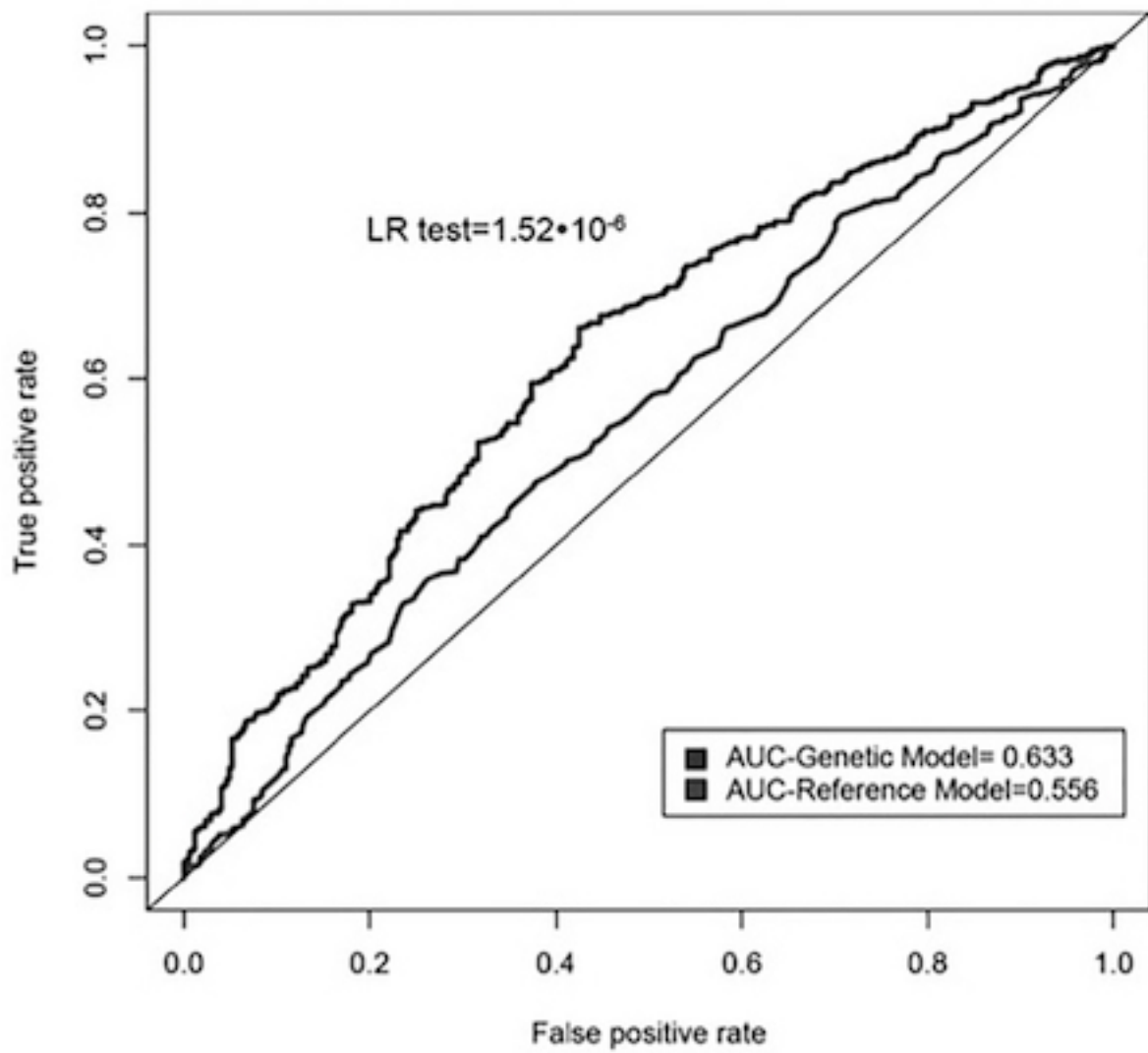


Table 1. Selected SNPs of hormone receptors and transporters as well as phase I- and II-metabolizing enzymes.

| Gene | Chr. | dbSNP rs# | Nucleotide substitution | Effect-allele | Location |
|----------------|------|------------|-------------------------|---------------|-----------|
| <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.

| RA patient populations | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Demographic characteristics | Discovery Population (n=1359) | DREAM [†] Registry (n=882) | DANBIO Registry (n=695) |
| <i>Age (years)</i> | 60.50 ± 13.04 | 54.63 ± 12.80 | 54.27 ± 13.30 |
| <i>Gender ratio (female/male)</i> | 4.27 (1101/258) | 2.07 (478/230) | 2.80 (512/183) |
| Clinical assessment | | | |
| <i>RF positive patients</i> | 708 (69.8) | 534 (77.62) | 221 (64.06) |
| <i>ACPA positive patients*</i> | 566 (70.9) | 151 (61.89) | 390 (72.90) |
| <i>DAS28 at baseline</i> | 5.80 ± 2.19 | 5.33 ± 1.26 | 4.77 ± 1.23 |
| <i>Disease duration (years)</i> | 18.69 ± 9.15 | 9.70 ± 9.57 | 7.89 ± 8.86 |
| Treatments | | | |
| <i>DMARDs at baseline</i> | | | |
| <i>Methotrexate (%)</i> | 812 (59.70) | 463 (65.40) | 514 (73.95) |
| <i>Leflunomide (%)</i> | 324 (23.82) | ND | ND |
| <i>Sulphasalazine</i> | 181 (13.31) | ND | ND |
| <i>First biologic agent</i> | | | |
| <i>Infliximab (%)</i> | 372 (27.35) | 244 (34.46) | 159 (22.88) |
| <i>Etanercept (%)</i> | 224 (16.47) | 130 (18.36) | 200 (28.78) |
| <i>Adalimumab (%)</i> | 190 (13.97) | 334 (47.18) | 173 (24.89) |
| <i>Golimumab (%)</i> | 16 (1.18) | - | 47 (06.76) |
| <i>Certolizumab (%)</i> | - | - | 72 (10.36) |
| <i>Rituximab (%)</i> | - | - | 16 (02.30) |
| <i>Tocilizumab (%)</i> | 6 (0.44) | - | 19 (02.73) |
| <i>Anakinra (%)</i> | - | - | 2 (00.29) |
| <i>Others (%)</i> | - | - | 7 (01.01) |

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. ND, not determined (unknown).

[†] Clinical data for 708 RA patients that had available DNA for genotyping.

* RF was available for 1014, 688 and 345 patients in the discovery, DREAM and DANBIO populations, respectively.

* ACPA was available for 798, 244 and 535 patients in the discovery, DREAM and DANBIO populations, respectively.

Table 3. Meta-analysis for the association of estrogen-related polymorphisms and relative change of DAS28 score (Δ DAS28).

| Gene | SNP ID | Chr. | Effect allele | Discovery population (n=548) | | | Replication DREAM registry (n=882) | | | Replication DANBIO Registry (n=555) | | | Meta-analysis (n=1985) | | |
|---------|------------|------|---------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--|
| | | | | OR (95% CI) [§] | P | P | OR (95% CI) [§] | P | P | OR (95% CI) [§] | P | P | OR (95% CI) [§] | P | |
| ABCB1 | rs1045642 | 7 | T | 1.01 (0.86-1.20) | 0.88 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ABCB1 | rs1922242 | 7 | A | 1.11 (0.94-1.32) | 0.21 | 0.98 (0.88-1.08) * | 0.67 | 0.67 | ND | ND | 1.02 (0.91-1.15) | 0.70 | 1.02 (0.91-1.15) | 0.70 | |
| ABCB1 | rs2229109 | 7 | T | 0.74 (0.51-1.07) | 0.11 | 1.09 (0.77-1.54) * | 0.63 | 0.63 | ND | ND | 0.90 (0.62-1.32) | 0.60 | 0.90 (0.62-1.32) | 0.60 | |
| ABCB1 | rs1202168 | 7 | T | 1.07 (0.90-1.27) | 0.43 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ABCB1 | rs9282564 | 7 | T | 1.16 (0.81-1.66) | 0.41 | 0.89 (0.72-1.10) | 0.29 | 0.29 | ND | ND | 0.98 (0.76-1.25) | 0.84 | 0.98 (0.76-1.25) | 0.84 | |
| ABCB1 | rs2214102 | 7 | T | NA (NA-NA) | NA | 0.96 (0.80-1.15) | 0.63 | 0.63 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| CYP1A1 | rs1799814 | 15 | A | 1.66 (1.19-2.34) | 0.003 | 1.03 (0.72-1.46) [‡] | 0.88 | 0.88 | 0.87 (0.56-1.36) [‡] | 0.53 | 1.16 (0.79-1.71) | 0.45 | 1.16 (0.79-1.71) | 0.45 | |
| CYP1A2 | rs762551 | 15 | A | 0.95 (0.79-1.14) | 0.57 | 0.95 (0.85-1.05) * | 0.32 | 0.32 | ND | ND | 0.95 (0.87-1.04) | 0.27 | 0.95 (0.87-1.04) | 0.27 | |
| CYP1B1 | rs1800440 | 2 | T | 0.96 (0.78-1.18) | 0.68 | 0.98 (0.85-1.13) | 0.78 | 0.78 | ND | ND | 0.97 (0.87-1.10) | 0.65 | 0.97 (0.87-1.10) | 0.65 | |
| CYP1B1 | rs1056836 | 2 | C | 1.34 (1.03-1.77)[§] | 0.032 | 1.04 (0.84-1.29) [§] | 0.72 | 0.72 | 0.83 (0.64-1.08) [§] | 0.17 | 1.05 (0.81-1.35) | 0.72 | 1.05 (0.81-1.35) | 0.72 | |
| CYP1B1 | rs10012 | 2 | G | 0.87 (0.72-1.04) | 0.12 | 1.01 (0.90-1.14) * | 0.83 | 0.83 | ND | ND | 0.95 (0.83-1.10) | 0.51 | 0.95 (0.83-1.10) | 0.51 | |
| CYP2C9 | rs1799853 | 10 | T | 0.80 (0.61-1.03) [†] | 0.088 | 0.87 (0.70-1.09) [†] | 0.24 | 0.24 | 0.74 (0.55-1.00) [†] | 0.052 | 0.81 (0.70-0.94) | 0.006 | 0.81 (0.70-0.94) | 0.006 | |
| CYP2C9 | rs1057910 | 10 | A | 0.92 (0.63-1.34) | 0.67 | 1.08 (0.90-1.31) | 0.42 | 0.42 | ND | ND | 1.05 (0.88-1.24) | 0.60 | 1.05 (0.88-1.24) | 0.60 | |
| CYP2C19 | rs12248560 | 10 | T | 1.21 (0.99-1.50) | 0.068 | 1.01 (0.89-1.13) * | 0.93 | 0.93 | ND | ND | 1.08 (0.91-1.29) | 0.37 | 1.08 (0.91-1.29) | 0.37 | |
| CYP2C19 | rs4244285 | 10 | A | 1.06 (0.84-1.34) | 0.63 | 1.01 (0.88-1.16) * | 0.88 | 0.88 | ND | ND | 1.02 (0.91-1.15) | 0.71 | 1.02 (0.91-1.15) | 0.71 | |
| CYP3A4 | rs2740574 | 7 | T | 0.85 (0.59-1.22) | 0.37 | 0.89 (0.69-1.15) * | 0.37 | 0.37 | ND | ND | 0.88 (0.71-1.08) | 0.22 | 0.88 (0.71-1.08) | 0.22 | |
| CYP3A4 | rs11773597 | 7 | C | 1.43 (1.10-1.86) | 0.008 | 1.51 (1.17-1.95)[‡] | 0.001 | 0.001 | 1.10 (0.80-1.50) [‡] | 0.57 | 1.36 (1.14-1.63) | 0.00074 | 1.36 (1.14-1.63) | 0.00074 | |
| CYP17A1 | rs743572 | 10 | G | 0.92 (0.77-1.08) | 0.30 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ESR1 | rs851984 | 6 | A | 1.03 (0.86-1.23) | 0.73 | 1.09 (0.97-1.22) * | 0.16 | 0.16 | ND | ND | 1.07 (0.97-1.18) | 0.16 | 1.07 (0.97-1.18) | 0.16 | |
| ESR1 | rs2881766 | 6 | T | 0.98 (0.79-1.21) | 0.82 | 1.03 (0.90-1.16) | 0.70 | 0.70 | ND | ND | 1.02 (0.91-1.13) | 0.77 | 1.02 (0.91-1.13) | 0.77 | |
| ESR1 | rs2071454 | 6 | G | 1.19 (0.91-1.56) | 0.20 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ESR1 | rs2077647 | 6 | G | 1.02 (0.86-1.21) | 0.86 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ESR1 | rs827421 | 6 | A | 0.95 (0.80-1.13) | 0.55 | 0.93 (0.85-1.03) * | 0.16 | 0.16 | ND | ND | 0.94 (0.86-1.02) | 0.12 | 0.94 (0.86-1.02) | 0.12 | |
| ESR1 | rs2234693 | 6 | C | 0.98 (0.83-1.16) | 0.81 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| ESR1 | rs9340799 | 6 | A | 1.06 (0.88-1.27) | 0.53 | 1.18 (1.02-1.36)[‡] | 0.019 | 0.019 | 0.95 (0.78-1.14) [‡] | 0.57 | 1.07 (0.95-1.22) | 0.28 | 1.07 (0.95-1.22) | 0.28 | |
| ESR1 | rs1801132 | 6 | G | 1.11 (0.91-1.36) | 0.31 | 0.98 (0.85-1.12) [‡] | 0.75 | 0.75 | 1.11 (0.88-1.39) [‡] | 0.40 | 1.04 (0.94-1.15) | 0.48 | 1.04 (0.94-1.15) | 0.48 | |
| ESR1 | rs3798577 | 6 | T | 1.03 (0.88-1.22) | 0.69 | 0.87 (0.76-0.99)[‡] | 0.031 | 0.031 | 0.99 (0.83-1.18) [‡] | 0.91 | 0.95 (0.85-1.06) | 0.35 | 0.95 (0.85-1.06) | 0.35 | |
| ESR1 | rs910416 | 6 | T | 0.99 (0.82-1.18) | 0.87 | 0.97 (0.88-1.07) * | 0.49 | 0.49 | ND | ND | 0.97 (0.89-1.06) | 0.56 | 0.97 (0.89-1.06) | 0.56 | |
| ESR2 | rs1255998 | 14 | G | 0.90 (0.70-1.14) | 0.38 | 1.10 (0.89-1.35) [‡] | 0.37 | 0.37 | 1.08 (0.81-1.45) [‡] | 0.60 | 1.06 (0.91-1.23) | 0.49 | 1.06 (0.91-1.23) | 0.49 | |
| ESR2 | rs928554 | 14 | T | 1.00 (0.84-1.20) | 0.98 | 0.94 (0.85-1.03) * | 0.19 | 0.19 | ND | ND | 0.95 (0.88-1.04) | 0.27 | 0.95 (0.88-1.04) | 0.27 | |

| | | | | | | | | | | | |
|---------|------------|----|---|-------------------------------------|--------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|------------------|--------------|
| ESR2 | rs4986938 | 14 | T | 0.97 (0.82-1.15) | 0.74 | 0.95 (0.86-1.06) ^ψ | 0.36 | 1.03 (0.87-1.23) ^ψ | 0.70 | 0.97 (0.90-1.05) | 0.46 |
| ESR2 | rs1271572 | 14 | A | 0.95 (0.79-1.14) | 0.56 | 0.92 (0.80-1.05) ^ψ | 0.23 | 0.96 (0.81-1.14) ^ψ | 0.66 | 0.94 (0.86-1.03) | 0.18 |
| GSTP1 | rs1695 | 11 | G | 1.22 (1.02-1.45) | 0.033 | 1.15 (0.99-1.33) ^ψ | 0.062 | 0.94 (0.79-1.11) ^ψ | 0.46 | 1.10 (0.95-1.28) | 0.22 |
| GSTP1 | rs1138272 | 11 | T | 1.55 (1.06-2.27)[†] | 0.023 | 1.15 (0.89-1.49) ^{†ψ} | 0.29 | 1.07 (0.76-1.51) ^{†ψ} | 0.69 | 1.21 (1.00-1.47) | 0.056 |
| HSD17B1 | rs605059 | 17 | T | 0.98 (0.83-1.17) | 0.86 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| NR1I2 | rs2276706 | 3 | A | 1.07 (0.90-1.27) | 0.45 | 0.98 (0.89-1.09) * | 0.73 | ND | ND | 1.00 (0.92-1.09) | 0.96 |
| NR1I2 | rs1464603 | 3 | C | 1.16 (0.96-1.39) | 0.12 | 1.05 (0.91-1.21) ^ψ | 0.48 | 0.84 (0.69-1.01) ^ψ | 0.066 | 1.01 (0.85-1.20) | 0.90 |
| NR1I2 | rs6785049 | 3 | G | 1.03 (0.87-1.23) | 0.71 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| NR1I2 | rs2276707 | 3 | T | 0.94 (0.75-1.19) | 0.61 | 1.13 (0.94-1.36) ^ψ | 0.20 | ND | ND | 1.05 (0.87-1.25) | 0.63 |
| NR1I2 | rs1054191 | 3 | A | 1.00 (0.80-1.26) | 0.99 | 1.06 (0.92-1.23) * | 0.37 | ND | ND | 1.04 (0.92-1.18) | 0.51 |
| NR1I2 | rs3814057 | 3 | C | 0.99 (0.78-1.24) | 0.89 | 1.10 (0.92-1.32) ^ψ | 0.30 | 0.87 (0.70-1.09) ^ψ | 0.23 | 0.99 (0.87-1.14) | 0.93 |
| PGR | rs1042838 | 11 | A | 0.97 (0.75-1.25) | 0.82 | 1.13 (0.99-1.29) | 0.076 | ND | ND | 1.09 (0.96-1.24) | 0.18 |
| PGR | rs1379130 | 11 | A | 1.13 (0.94-1.36) | 0.19 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| PGR | rs10895068 | 11 | A | 0.75 (0.50-1.13) | 0.17 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| PGR | rs518162 | 11 | A | 0.74 (0.56-0.99) | 0.042 | 0.84 (0.68-1.03) | 0.094 | 1.07 (0.73-1.58) | 0.72 | 0.84 (0.71-1.00) | 0.046 |
| SHBG | rs6259 | 17 | A | 0.87 (0.66-1.16) | 0.35 | 1.00 (0.86-1.18) | 0.96 | ND | ND | 0.97 (0.84-1.11) | 0.64 |
| SULT1A1 | rs9282861 | 16 | A | 0.80 (0.67-0.96) | 0.017 | 1.05 (0.91-1.21) ^ψ | 0.50 | 1.04 (0.85-1.27) ^ψ | 0.72 | 0.96 (0.81-1.14) | 0.63 |

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

A random effect model was assumed for the meta-analysis of both cohorts.

^a Estimates calculated according to an additive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin (or age and sex in the replication stages).

[†] Estimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin (or age and sex in the replication stages).

[§] Estimates calculated according to a recessive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin (or age and sex in the replication stages).

^ψ These SNPs were genotyped in the DREAM (n=708) and DANBIO (n=555) registries using KASPar® assays.

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

No significant heterogeneity (heterogeneity chi-squared) was observed in any meta-analysis reported above.

Table 4. Haplotype association analysis for anti-TNF drug response.

| ESR2* | | Overall R vs. NR+MR (N=1811) | | |
|---------------------------|---|------------------------------------|---------------------------|----------------|
| | | Freq | OR(95%CI) [†] | P |
| ESR2 ^{rs1255998} | C | 0.3273 | 1.00 | --- |
| ESR2 ^{rs1271572} | T | 0.3079 | 0.98 (0.81 - 1.20) | 0.88 |
| ESR2 ^{rs4986938} | G | 0.1301 | 1.01 (0.78 - 1.30) | 0.97 |
| | A | 0.1155 | 0.93 (0.71 - 1.21) | 0.57 |
| | G | 0.0916 | 0.64 (0.49 - 0.83) | 0.00090 |
| | A | 0.0162 | 0.78 (0.36 - 1.71) | 0.53 |
| | T | 0.0106 | 1.56 (0.56 - 4.35) | 0.39 |
| GSTP1 | | R vs. NR+MR (N=1811) | | |
| | | Freq | OR(95%CI) [†] | P |
| GSTP1 ^{rs1695} | A | 0.6409 | 1.00 | --- |
| GSTP1 ^{rs138272} | C | 0.2819 | 0.89 (0.76 - 1.05) | 0.16 |
| | T | 0.0714 | 0.70 (0.54 - 0.93) | 0.012 |

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

[†]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.

Table 5. Discriminative value *AUC* for models including estrogen-related variants.

| Reference model* | | | | LR test p-value |
|-------------------------------------|---------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | |
| Gender | 0.932 | 0.987 (0.739-1.320) | | |
| Age | 0.0056 | 1.014 (1.004-1.025) | | |
| RF | 0.382 | 1.142 (0.848-1.537) | 0.556 (0.52-0.59) ^δ | |
| Predictive model including 8 SNPs** | | | | |
| | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | |
| <i>CYP3A4</i> _{rs11773597} | 0.068 | 0.711 (0.492-1.026) | | |
| <i>CYP2C9</i> _{rs1799853} | 0.070 | 1.333 (0.977-1.819) | | |
| <i>ESR1</i> _{rs3798577} | 0.016 | 1.432 (1.068-1.919) | | |
| <i>ESR2</i> _{rs1255998} | 0.012 | 0.656 (0.473-0.910) | | |
| <i>ESR2</i> _{rs1271572} | 0.042 | 1.364 (1.011-1.840) | | |
| <i>GSTP1</i> _{rs1695} | 0.048 | 0.759 (0.577-0.998) | | |
| <i>NR1I2</i> _{rs1464603} | 0.0028 | 1.502 (1.150-1.962) | | |
| <i>CYP1A1</i> _{rs1799814} | 0.014 | 0.577 (0.372-0.895) | | |
| Gender | 0.858 | 1.028 (0.763-1.384) | | |
| Age | 0.0096 | 1.014 (1.003-1.025) | | |
| RF | 0.380 | 1.146 (0.845-1.555) | 0.633 (0.60-0.67) ^{δ ‡} | 1.52•10⁻⁶ |

^aIncluding age, gender and RF as variables never dropped from models and when are compared with a baseline model with AUROC=0.5.

*Including age, gender and RF as covariates.

**SNPs showing a significant association with response to anti-TNF drugs in the genetic model ($P < 0.10$).

After removing missing values, 1032 subjects were available for prediction capacity analysis.

^δ 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, $df=6$, $P=1.52E-06$).

Residual deviance (Reference model): 1311.3

Residual deviance ("Significant SNPs model): 1269.6

[‡] 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)=0.5752

Z score=6.35, $P_{Z_score-value_ (50.000perm)}=1.06•10^{-10}$.

1 Steroid hormone-related polymorphisms influence the 2 risk of developing bone erosions in rheumatoid arthritis 3 and improve the prediction of disease progression 4

5 Jose M. Sánchez-Maldonado^{1,2}, Rafael Cáliz MD, PhD^{1,2,3}, Luz Canet PhD¹, Rob ter Horst⁴, Olivier
6 Bakker PhD⁵, Alfons A den Broeder MD PhD⁶, Manuel Martínez-Bueno PhD⁷, Helena Canhão MD,
7 PhD⁸, Ana Rodríguez Ramos¹, Carmen B. Lupiañez PhD¹, María José Soto-Pino³, Antonio García
8 MD PhD³, Eva Pérez-Pampin MD PhD⁹, Alfonso González-Utrilla MD PhD³, Alejandro Escudero MD
9 PhD¹⁰, Juana Segura-Catena¹, Romana T. Netea-Maier PhD⁴, Miguel A. Ferrer MD PhD³,
10 Eduardo Collantes-Estevez MD PhD¹⁰, Miguel Ángel López Nevot MD PhD¹¹, Yang Li PhD⁵,
11 Manuel Jurado^{1,2}, João E. Fonseca MD PhD^{12,13}, Mihai G. Netea MD PhD^{4,14},
12 Marieke J. H. Coenen PhD¹⁵, Juan Sainz PhD^{1,2}
13

- 14 ¹ Genomic Oncology Area, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of
15 Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain
16 ² Instituto de Investigación Biosanitaria IBs.Granada, Granada, Spain
17 ³ Rheumatology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain
18 ⁴ Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University
19 Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands
20 ⁵ Department of Genetics, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The
21 Netherlands
22 ⁶ Department of Rheumatology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.
23 ⁷ Area of Genomic Medicine, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of
24 Granada / Andalusian Regional Government, Granada, Spain
25 ⁸ CEDOC, EpiDoC Unit, NOVA Medical School and National School of Public Health, Universidade Nova de
26 Lisboa, Lisbon, Portugal.
27 ⁹ Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
28 ¹⁰ Rheumatology department, Reina Sofía Hospital/IMIBIC/University of Córdoba, Córdoba, Spain
29 ¹¹ Immunology department. Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain
30 ¹² Rheumatology and Metabolic Bone Diseases Department, Hospital de Santa Maria, CHLN, Lisbon,
31 Portugal
32 ¹³ Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon,
33 Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal
34 ¹⁴ Department for Immunology & Metabolism, Life and Medical Sciences Institute (LIMES), University of
35 Bonn, 53115 Bonn, Germany
36 ¹⁵ Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Radboud Institute for Health
37 Sciences, Nijmegen, The Netherlands.
38
39

40 Corresponding author:

41 Juan Sainz, PhD

42 Genomic Oncology Area

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

44 Andalusian Regional Government

45 PTS Granada

46 Avda. de la Ilustración, 114

47 18016 Granada, Spain

48 Phone: +34-958-715500

49 Fax: +34-958-637071

50 E-mail: juan.sainz@genyo.es
51
52

53 Word Count: Abstract 286, Text 3981

54 Tables and Figures: 5 Tables (1 Supplementary Table) and 2 Figure (1 Supplementary Figure).

55 **ABSTRACT**

56 This study aimed at assessing whether 41 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within steroid
57 hormone-related genes influenced the risk of developing erosive disease in a population of 816
58 Rheumatoid Arthritis (RA) patients. After correction for multiple testing, our results showed a strong
59 rheumatoid factor (RF)-specific effect modification of the *ESR2*_{rs1271572} and *CYP2C9*_{rs1799853} SNPs to
60 modulate the risk of developing bone erosions ($OR_{RF+}=0.38$, $P=0.0002$ vs. $OR_{RF-}=1.08$, $P=0.83$;
61 $P_{Interaction}=0.018$ and $OR_{RF+}=0.16$, $P=0.0007$ vs. $OR_{RF-}=2.71$, $P=0.23$; $P_{Interaction}=0.003$). Importantly,
62 the RF-specific association of the *ESR2*_{rs1271572T/T} genotype with the risk of developing bone
63 erosions was confirmed through meta-analysis with data from the DREAM registry ($n=709$, OR_{META-}
64 $RF+}=0.52$, $P_{META-RF+}=0.0008$ vs. $OR_{META-RF-}=2.43$, $P_{META-RF-}=0.13$) whereas the RF-specific effect
65 found for the *CYP2C9*_{rs1799853T/T} genotype could not be estimated due to the lack of seropositive
66 patients carrying that genotype. However, we also found a gender-specific correlation of the
67 *CYP2C9*_{rs1799853T/T} genotype or T allele with serum vitamin D3 levels ($P=0.00085$ and 0.0019) and a
68 modest overall effect on IL1 β levels after stimulation of PBMCs or whole blood with LPS and PHA
69 ($P=0.0057$ and $P=0.0058$). Haplotype analysis confirmed the significant RF-specific effect of *ESR2*
70 and *CYP2C9* haplotypes on the risk of developing bone erosions ($P_{RF+}=0.0051$ and $P_{RF+}=0.0075$)
71 but also an overall association of 3 *ESR1* haplotypes with a reduced risk of erosive arthritis
72 ($P=0.009$, $P=0.002$, and $P=0.002$). Furthermore, we observed that *ESR2* SNPs correlated with
73 *ESR2* mRNA expression levels in PBMCs (ranging from $P=2.60\cdot 10^{-5}$ to $P=8.33\cdot 10^{-23}$) and that
74 polymorphisms within *ESR2* and *ESR1* loci influenced the immune response after stimulation of
75 PBMCs or macrophages with LPS or Pam3Cys ($P=0.002$, 0.0008 and 0.0011). Finally, we found
76 that a model built with steroid hormone-related SNPs significantly improved the prediction of erosive
77 disease in seropositive patients ($AUC_{Genetic}=0.73$ vs. $AUC_{Demographic}=0.63$; $P=2.46\cdot 10^{-8}$) whereas no
78 prediction was detected in seronegative patients ($AUC_{Genetic}=0.61$ vs. $AUC_{Demographic}=0.59$; $P=0.36$).
79 These results are the first to provide evidence of a RF-specific effect of steroid hormone
80 polymorphisms to modulate the appearance of bone erosions in RA patients.

81 **Keywords:** Rheumatoid arthritis, steroid hormone-related polymorphisms, erosive disease.

82 **INTRODUCTION**

83 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and disabling chronic immune-mediated inflammatory
84 disease that affects approximately 1% of the worldwide population¹. Although the etiology of this
85 autoimmune disease remains largely unknown, family- and population-based genome-wide
86 association studies (GWAS) have consistently demonstrated that RA has a strong inherited
87 component that influences not only the predisposition to develop the disease²⁻⁵. Even though there
88 are no relevant predictors for treatment response in RA⁶, recent studies have suggested that
89 inherited genetic factors might influence the response to both classical disease-modifying anti-
90 rheumatic or biological drugs⁷⁻¹¹ and even disease progression¹²⁻¹⁴. From epidemiological studies, it
91 has also been proposed that in addition to inherited factors and environmental factors certain
92 hormonal events might help to promote the onset of the disease¹⁵⁻¹⁷. It has been suggested that
93 concentrations of steroid hormones and circulating immunocomplexes (CICs) in the synovial fluid
94 and cartilage may contribute to promote gender-specific inflammatory responses, a differently
95 controlled and sustained production of autoantibodies between men and women¹⁸⁻²⁰ and a different
96 release of a wide range of cytokines and pro-inflammatory mediators that trigger sustained and
97 chronic inflammatory responses²¹⁻²³. However, there is still controversy about the effect of steroid
98 hormones on the risk of developing RA or disease progression since the administration of different
99 hormone replacement therapies or the use of oral contraceptives has not been associated with the
100 risk of RA and its progression in most of the epidemiological studies conducted to date²⁴⁻²⁷.

101

102 Some authors have hypothesized that these controversial results might be, at least in part, due to
103 the presence of certain factors such as the HLA-DRB1 shared epitope or specific autoantibodies
104 such as antibodies to cyclic citrullinated peptide (anti-CCP)^{28,29}. Furthermore, there are
105 contradictory results concerning to the role of steroid hormones in the modulation of immune
106 responses. Some studies have reported, for instance, that vitamin D3 has immunomodulatory
107 properties that may influence autoimmune disease risk and disease progression³⁰ whereas some
108 other have suggested that estrogens can induce both tolerogenic and pro-inflammatory responses

109 at multiple levels and that this may result in remarkable sex differences on immune function. Under
110 appropriate circumstances, estrogens may inhibit Th₁- and Th₁₇-mediated immune functions^{31,32} and
111 stimulate Treg cell development³³ and the activation of Th₂-mediated immune responses. However,
112 it has been also demonstrated that estrogens may induce pro-inflammatory responses. For
113 instance, it has been suggested that estrogens influence *FCGR3A* mRNA gene expression and
114 induce the *FCGR3A*-mediated release of tumor necrosis factor (TNF) and IL1 β from monocytes³⁴,
115 thereby modulating degranulation, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), transcription of
116 cytokine genes, rapid release of inflammatory mediators and reactive oxygen species, and
117 phagocytosis³⁵⁻³⁷. Considering the role of Fc γ R proteins in modulating autoimmune responses but
118 also the plausibility of a gender-specific effect of estrogens to modulate immune responses, we
119 aimed at analyzing whether the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within steroid
120 hormone signaling (*ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *NR1I2*), phase I- and II-metabolizing enzyme (*HSD17B1*,
121 *CYP1A1*, *CYP17A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4* and *GSTP1*) and Fc gamma
122 receptor (*FCGR3A* and *FCGR2A*) genes influence disease progression in RA. We assessed
123 whether 41 potentially functional SNPs within these genes are associated with the risk of
124 developing erosive disease and whether the effect of the SNPs on disease progression was
125 modified by the presence of rheumatoid factor (RF) or anti-CCP. In order to confirm the consistency
126 of our results, we performed random-effect meta-analyses with data from the DREAM registry.
127 Finally, we also evaluated whether selected polymorphisms correlated with steroid hormone and
128 cytokine levels and whether genotyping of selected SNPs might help us to improve the prediction of
129 the appearance of bone erosions.

130

131 **PATIENTS AND METHODS**

132 *Study population*

133 This retrospective cohort study included 816 RA patients, five hundred and sixty-seven showing
134 erosive disease and 249 without bone erosions. RA patients fulfilled the 1987 revised American
135 College of Rheumatology (ACR)³⁸ and the ACR/EULAR 2010 classification criteria³⁹. A detailed

136 description of the population has been reported elsewhere⁴⁰⁻⁴². Briefly, five hundred and eighteen
137 RA patients were recruited at the department of Rheumatology of the Virgen de las Nieves Hospital
138 (Granada, Spain), the Reina Sofia Hospital (Córdoba, Spain), and the University Clinical Hospital of
139 Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, Spain). Two hundred and ninety-eight RA
140 patients were additionally recruited from the Santa Maria Hospital-CHLN (Biobanco-IMM; Lisbon
141 Academic Medical Centre, Lisbon, Portugal). The study complied with Declaration of Helsinki. All
142 participants were of European ancestry and gave their written informed consent to participate in the
143 study. The Ethics committee of each participant institution approved the study protocol: Virgen de
144 las Nieves University Hospital (2012/89); Santa Maria Hospital-CHLN (CE 877/121.2012);
145 University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (2013/156). A detailed description of
146 demographic and clinical variables of this population is included in Table 1.

147

148 *Bone erosions*

149 Bone erosions defined as the interruption of the cortical bone within the joint region or underlying
150 the cartilage were detected by conventional X-rays and were coded as present or absent.

151

152 *SNP and genotyping*

153 Genotyping of selected steroid hormone-related SNPs (Table 2) was performed using KASPar®
154 probes with the exception of the *FcγR3A*_{rs396991} and *FCγR2A*_{rs1801274} SNPs that were determined
155 using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Both KASPar®
156 and Taqman® assays were assayed according to the manufacturer's specifications for a 384-well
157 plate format. Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using
158 Qiagen Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and PCR products were analyzed with ABI Prism
159 7900HT detection system using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). Five percent of
160 samples were included in the PCR plates as duplicates and concordance between the analyzed
161 original and duplicated samples was >99.0%.

162

163 *Statistical analysis*

164 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was assessed in the control group by a chi-square (χ^2) test.
165 Logistic regression analysis adjusted for age, sex and country of origin was used to assess the
166 main effect of the selected SNPs on disease progression (defined as the appearance of bone
167 erosions). Haplotype analysis using the same variables for adjustment was conducted using the R
168 package Haplo.stats⁴³. In order to facilitate eventual meta-analyses, the major allele was set as
169 reference allele. RF- and anti-CCP-stratified analyses were carried out to evaluate whether there
170 was any evidence of effect modification by these factors. All tests were conducted using the
171 statistical software STATA (v.12) and R (<http://www.r-project.org>). In order to account for multiple
172 testing, we set a *P* value of 0.00074 as significance study-wide threshold. The *P* value was
173 calculated considering the number of independent polymorphisms analyzed (n=34, MeffLi
174 method)⁴⁴ but also the number of inheritance models tested (dominant and recessive).

175

176 *Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis*

177 We performed haplotype frequency estimation and haplotype association analysis adjusted for age,
178 sex and country of origin using the haplo.stats⁴³. Haplotype frequencies were determined using the
179 Expectation-maximization (EM) algorithm and haplotypes were reconstructed using
180 SNP_tools⁴⁵ and Haploview⁴⁶. Block structures were determined according to the method of Gabriel
181 *et al.*⁴⁷ (Supplementary Figure 1).

182

183 *Replication population and meta-analysis*

184 With the aim of assessing the consistency of the overall and RF-specific associations between
185 SNPs and the risk of developing bone erosions, we genotyped the most interesting markers in a
186 replication population from the DREAM registry consisting of 436 RA patients (307 RA patients with
187 bone erosions and 129 patients without erosive disease). Demographic and clinical parameters of
188 this population are also included in Table 1. We performed a meta-analysis of the data obtained in
189 the discovery population with those from the DREAM registry and we pooled the Odds Ratios (ORs)

190 for the most interesting polymorphisms using a random-effect model that assumes that the effect
191 size may or may not vary from study to study. Coefficients with a P -value ≤ 0.05 were considered
192 significant. I^2 statistic was used to assess heterogeneity between studies.

193

194 *Functional analysis of the estrogen-related variants*

195 Cytokine stimulation experiments were conducted in the 500 Functional Genomics (500FG) cohort
196 from the Human Functional Genomics Project (HFGP; <http://www.humanfunctionalgenomics.org/>),
197 which was designed to determine the influence of genomic variation on the variability of immune
198 responses. The HFGP study was approved by the Arnhem-Nijmegen Ethical Committee (no.
199 42561.091.12) and biological specimens were collected after informed consent was obtained. We
200 investigate whether any of the 41 estrogen-related SNPs correlated with cytokine levels (IFN γ , IL1 β ,
201 IL6, TNF α , IL17, and IL22) after the stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs),
202 macrophages or whole blood from 408 healthy subjects with LPS (1 or 100 ng/ml), PHA (10 μ g/ml),
203 and Pam3Cys (10 μ g/ml). After log transformation, linear regression analyses adjusted for age and
204 sex were used to determine the correlation of selected SNPs with cytokine expression quantitative
205 trait loci (cQTLs). All analyses were performed using R software (<http://www.r-project.org/>). In order
206 to account for multiple comparisons, we used a significant threshold of 0.00025 (0.05/34
207 independent SNPs x 6 cytokines).

208

209 Details on PBMCs isolation, macrophage differentiation and stimulation assays have been reported
210 elsewhere⁴⁸⁻⁵⁰. Briefly, PBMCs were washed twice in saline and suspended in medium (RPMI 1640)
211 supplemented with gentamicin (10 mg/mL), L-glutamine (10 mM) and pyruvate (10 mM). PBMC
212 stimulations were performed with 5×10^5 cells/well in round-bottom 96-wells plates (Greiner) for 24
213 hours in the presence of 10% human pool serum at 37°C and 5% CO $_2$. Supernatants were collected
214 and stored in -20°C until used for ELISA. LPS (100ng/ml), PHA (10 μ g/ml) and Pam3Cys (10 μ g/ml)
215 were used as stimulators for 24 or 48 hours. Whole blood stimulation experiments were conducted
216 using 100 μ l of heparin blood that was added to a 48 well plate and subsequently stimulated with

217 400µl of LPS and PHA (final volume 500ul) for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. Supernatants were
218 collected and stored in -20°C until used for ELISA. Concentrations of human IFN γ , IL1 β , IL6, TNF α ,
219 IL17, and IL22 were determined using specific commercial ELISA kits (PeliKine Compact,
220 Amsterdam, or R&D Systems), in accordance with the manufacturer's instructions.

221

222 Once we assessed the correlation of estrogen-related SNPs with cytokine levels, we used the
223 HaploReg SNP annotation tool (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) to
224 further investigate the functional consequences of each specific variant. We also assessed whether
225 any of the potentially interesting markers correlated with mRNA expression levels of their respective
226 genes using data from public eQTL browsers (GTEx portal; www.gtexportal.org/home/ and Blood
227 eQTL browser; <https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>).

228

229 *Correlation between steroid hormone levels and hormone-related SNPs*

230 We also measured serum levels of seven steroid hormones (androstenedione, cortisol, 11-deoxy-
231 cortisol, 17-hydroxy progesterone, progesterone, testosterone and 25 hydroxy vitamin D3) in the
232 500FG cohort which includes 531 healthy subjects. Hormone levels and genotyping data were
233 available for a total of 406 subjects.

234

235 Cortisol, 11-deoxycortisol, androstenedione and 17-hydroxyprogesterone were analyzed by Liquid
236 Chromatography Tandem-Mass Spectrometry (LCMSMS) after protein precipitation and solid-phase
237 extraction as described in Ter Horst et al. (2016)⁵⁰ with the following additional compound specific
238 configurations and characteristics. Internal standard [¹³C₃]-cortisol (Isoscience, King of Prussia, PA),
239 ²H₅-11-deoxycortisol (Isoscience, King of Prussia, PA), [¹³C₃]- androstenedione (Isoscience, King of
240 Prussia, PA) and [¹³C₃]-17-hydroxyprogesterone (Isoscience, King of Prussia, PA) were used.
241 Retention time was 1.46 min, 2.68 min, 3.70 min and 4.78 min for cortisol, 11-deoxycortisol,
242 androstenedione and 17-hydroxyprogesterone respectively. An 9-point calibration curve was used
243 cortisol (Sigma); 11-deoxycortisol (Sigma); androstenedione (Sigma) and 17-hydroxyprogesterone

244 (Sigma). Two transitions (qualitative and quantitative) were monitored. Transitions (Q1>Q3) were
245 m/z 363.4 > 121.1 (25kEV) and m/z 363.4 > 97.1 (34 kEV) for cortisol; m/z 366.4 > 124.1 (25 kEV)
246 and m/z 366.4 > 100.1 (35 kEV) for ¹³C₃-cortisol; m/z 347.2 > 97.1 (29 kEV) and m/z 347.2 > 109.1
247 (31 kEV) for 11-deoxycortisol; m/z 352.3 > 100.1 (31 kEV) and m/z 352.3 > 113.1 (29 kEV) for ²H₅-
248 11-deoxycortisol; m/z 387.2 > 97.1 (23 kEV) and m/z 387.2 > 109.1 (26 kEV) for androstenedione;
249 m/z 290.2 > 100.1 (21 kEV) and m/z 290.2 > 112.1 (26 kEV) for ¹³C₃- androstenedione; m/z 331.3 >
250 97.1 (31 kEV) and m/z 331.3 > 109.1 (31 kEV) for 17-hydroxyprogesterone; m/z 334.3 > 100.1 (30
251 kEV) and m/z 334.3 > 112.1 (33 kEV) for ¹³C₃-17-hydroxyprogesterone. Dwell time was 100 ms, 40
252 ms, 100 ms and 60 ms for cortisol, 11-deoxycortisol, androstenedione and 17-hydroxyprogesterone,
253 respectively. The method was linear assessed by CLSI EP6 protocol. Recovery was within 96.5 –
254 102% cortisol, 98.4 – 104% 11-deoxycortisol, 99.4 – 99.8% androstenedione and 98.6 – 102% 17-
255 hydroxyprogesterone. Total CV for cortisol is 3,6% at 301 nmol/L and 3,1% at 1092 nmol/L. Total
256 CV for 11-deoxycortisol is 5,9% at 2,1 nmol/L and 5,1% at 27 nmol/L. Total CV for androstenedione
257 is 4,7% at 3,2 nmol/L and 4,1% at 23 nmol/L. Total CV for 17-hydroxyprogesterone is 5,6% at 2,6
258 nmol/L and 5,1% at 95 nmol/L. LOQ was 1.91 nmol/L (13.4% CV), 0.10 nmol/L (10% CV), 0.05
259 nmol/L (10% CV) and 0.10 nmol/L (10% CV) for cortisol, 11-deoxycortisol, androstenedione and 17-
260 hydroxyprogesterone respectively.

261

262 After log-transform, correlation between steroid hormone levels and steroid hormone-related SNPs
263 was evaluated by linear regression analysis adjusted for age and sex (or for age when men and
264 women were analysed separately). In order to avoid a possible bias, we excluded from the analysis
265 those subjects that were using oral contraceptives or those subjects in which this information was
266 not available. A total of 279 healthy subjects (107 women and 272 men) were finally available for
267 analysis. Significance threshold was set to 0.00021 considering the number of independent SNPs
268 tested (n=34) and the number of hormones determined (n=7).

269

270 *Predictive models and discriminative accuracy*

271 The value of steroid hormone-related variants for prediction of prognosis and disease progression in
272 seropositive and seronegative RA patients was assessed using stepwise logistic regression. Models
273 were built including demographic variables (age and sex) and genetic polymorphisms that showed
274 significant associations with erosive disease in the single-SNP analysis ($P<0.05$). The genetic
275 model was then compared with the reference model including demographic variables. The area
276 under the curve (AUC) of a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and -2 log
277 likelihood ratio (LR) tests were used to assess whether the genetic models fitted significantly better
278 the data compared to their respective reference models. Finally, we run randomization tests to
279 confirm whether the improved predictive ability of each genetic model was consistent after 50.000
280 iterations. All tests were conducted using R software (<http://www.r-project.org/>).

281

282 **RESULTS**

283 Erosive RA patients had a similar age than those patients without bone erosions (59.66 ± 12.47 vs.
284 58.95 ± 14.30 , $P<0.526$) and had a significantly higher female to male ratio ($514/43=11.95$ vs.
285 $182/27=6.74$, $P<0.001$; Table 2). Overall, the percentage of RA patients with positive RF and anti-
286 CCP was 70.58% and 72.80% respectively, and these percentages were slightly higher among
287 those patients with bone erosions (76.12% and 75.05%) than in those without erosive disease
288 (60.00% and 67.34%). The mean of disease follow-up was 18.6 years whereas the mean of DAS28
289 was 5.63. Six hundred and three patients received methotrexate (79.24%) and 632 patients
290 (77.45%) were treated with biologic therapies (Table 1).

291

292 *Association of steroid hormone-related polymorphisms with the risk of having bone erosions*

293 Selected polymorphisms did not show deviation from HWE in the control population (patients
294 without erosive disease; $P>0.001$). Logistic regression analysis adjusted for age, gender and
295 country of origin revealed that carriers of the *ESR2*_{rs1271572T/T} genotype tended to have a decreased
296 risk of developing erosive disease than those subjects carrying the G allele (OR=0.55, 95%CI 0.37-
297 0.82; $P=0.004$; Table 3). We also found that carriers of the *ESR1*_{rs1801132G} allele had a decreased

298 risk of having bone erosions (OR=0.71, 95%CI 0.52-0.97; $P=0.034$). Although the association of the
299 *ESR2*_{rs1271572T/T} genotype with a decreased risk of having bone erosions remained only marginally
300 significant after correction for multiple testing, we found a significant RF-specific effect of this SNP
301 to modulate the risk of having erosive disease. Seropositive patients carrying the *ESR2*_{rs1271572T/T}
302 genotype had a significantly reduced risk of developing erosive disease (OR=0.38, 95%CI 0.23-
303 0.63; $P=0.0002$) whereas an opposite but not significant effect was found in seronegative patients
304 (OR=1.08, 95%CI 0.54-2.14; $P=0.83$; $P_{\text{Interaction}}=0.018$; Table 3). Importantly, the association of the
305 *ESR2*_{rs1271572} SNP with a reduced risk of developing bone erosions in seropositive patients remained
306 significant after correction for multiple testing ($P<0.00074$) and the meta-analysis of our data and
307 those from the DREAM registry, including 1252 RA patients, confirmed that seropositive patients
308 carrying the *ESR2*_{rs1271572T/T} genotype had a decreased risk of developing erosive disease
309 (OR_{RF+}=0.51, 95%CI 0.35-0.76; $I^2=0.062$, $P=0.0007$) whereas a totally opposite but not statistically
310 significant effect was found in seronegative patients (OR=2.43, 95%CI 0.76-7.72; $I^2=0.85$, $P=0.13$).
311 No significant anti-CCP effect modification was found for this SNP to modulate the risk of
312 developing bone erosions ($P_{\text{Interaction}}=0.11$; Supplementary Table 1), which suggest that *ESR2* locus
313 might play a relevant role in determining disease progression in a RF-dependent manner. In
314 agreement with these results, we found a RF-specific effect of the *ESR2*_{CGTA} haplotype to determine
315 the risk of developing erosive disease. Seropositive RA patients carrying the *ESR2*_{CGTA} haplotype
316 (and, therefore, not harboring the *ESR2*_{rs1271572} protective allele) showed an increased risk of
317 developing bone erosions (OR_{RF+}=1.63, 95%CI 1.20-2.25; $P=0.0051$) whereas an opposite but not
318 significant effect was detected in seronegative patients (OR_{RF-}=0.93, 95%CI 0.62-1.40; $P=0.99$;
319 Table 4). An overall haplotype analysis including 1252 RA patients from the discovery and
320 replication populations confirmed the RF-specific association of the *ESR2*_{CGTA} haplotype with an
321 increased risk of developing bone erosions (OR_{RF+}=1.44, 95%CI 1.13-1.84; $P=0.0036$ and OR_{RF-}
322 =0.89, 95%CI 0.62-1.26; $P=0.51$). According to publicly available gene expression datasets (GTEx
323 portal and Haploreg), the *ESR2*_{rs1271572} variant strongly correlate with *ESR2* mRNA expression
324 levels in whole peripheral blood ($P=3.1\cdot 10^{-9}$; Figure 1) but also in primary B cells, lymphoblastoid

325 cell lines (from $P=1.98 \cdot 10^{-6}$ to $P=3.47 \cdot 10^{-10}$) and several tissues (ranging from $P=2.60 \cdot 10^{-5}$ to
326 $P=8.33 \cdot 10^{-23}$). Intriguingly, a similar level of correlation with gene expression was found for other
327 variants belonging to the $ESR2_{C \rightarrow T/A}$ haplotype (Supplementary Table 2), which strongly suggested
328 that this haplotype might represent an eQTL for $ESR2$. Interestingly, we also found that the
329 $ESR2_{rs4986938T}$ allele associated with reduced levels of $TNF\alpha$ after the stimulation of PBMCs with
330 Pam3Cys for 24h ($P=0.0022$; Figure 2A). These results along with those reporting that the
331 $ESR2_{rs4986938}$ and $ESR2_{rs1271572}$ SNPs map among histone marks in multiple cell types including
332 osteoblasts and different subsets of immune cells, suggest a possible functional role of the $ESR2$
333 variants in modulating the appearance of bone erosions likely through the modulation of $ESR2$
334 expression. No significant impact of the $ESR2$ SNPs on hormones levels was detected (data not
335 shown).

336

337 Similarly, we also found a RF-specific effect of the $CYP2C9_{rs1799853}$ SNP to determine the risk of
338 developing bone erosions. Seropositive patients carrying the $CYP2C9_{rs1799853T/T}$ genotype had a
339 significantly reduced chance of developing bone erosions (OR=0.16, 95%CI 0.06-0.46; $P=0.0007$)
340 whereas an opposite but not significant effect was observed in seronegative patients (OR=2.71,
341 95%CI 0.53-13.8; $P=0.23$; $P_{Interaction}=0.003$; Table 3). The effect of the $CYP2C9_{rs1799853}$ polymorphism
342 on the risk of developing erosive disease in seropositive patients remained statistically significant
343 after correction for multiple testing ($P<0.00074$), which suggested a role of the $CYP2C9$ gene in
344 modulating disease progression in RA. In accordance with these findings, we found that
345 seropositive patients carrying the $CYP2C9_{AT}$ haplotype had a significantly decreased risk of
346 developing erosive disease (OR $_{RF+}$ =0.61, 95%CI 0.43-0.88; $P=0.0075$) whereas no effect was
347 observed in seronegative patients (OR $_{RF-}$ =0.87, 95%CI 0.53-1.42; $P=0.57$; Table 4). No significant
348 anti-CCP effect modification was found for this variant to determine the appearance of bone
349 erosions ($P_{Interaction}=0.88$) underlying the importance of considering RF when evaluating the impact
350 of the $CYP2C9$ variant on the risk of developing erosive disease. Although we attempted to validate
351 the RF-specific association of the $CYP2C9_{rs1799853T/T}$ genotype with a decreased risk of having

352 erosive disease through a meta-analysis with data from the DREAM registry, the relatively small
353 size of the replication population did not allow us to perform the association analysis according to a
354 recessive model of inheritance. However, it is important to mention that besides the previously
355 reported role of the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP in controlling the metabolism of a wide range of drugs
356 (with the T allele acting as poor metabolizer), we found that this coding variant strongly correlated
357 with serum vitamin D3 levels in women ($P=0.00085$ and $P=0.0019$; Figure 3) whereas no effect was
358 detected in men. Intriguingly, we found that the presence of the *CYP2C9*_{rs1799853T} allele also
359 correlated with an increased production of IL1 β after the stimulation of PBMCs with LPS or PHA for
360 24h or 48h ($P=0.0057$ and $P=0.0058$; Figure 2B and 2C). Although none of the associations found
361 in cytokine stimulation experiments remained significant after correction for multiple testing, the
362 association of the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP with reduced levels of vitamin D3 in women remained
363 borderline significant, which suggested that this marker might have a role in the modulation of bone
364 homeostasis and vitamin D3-mediated immune responses.

365

366 Besides the RF-specific effect reported for the *ESR2*_{rs1271572} and *CYP2C9*_{rs1799853} variants on the risk
367 of having erosive disease, an overall association analysis revealed that carriers of the *ESR1*_{rs1801132G}
368 allele showed a decreased risk of developing bone erosions (OR=0.71, 95%CI 0.52-0.97; $P=0.034$).
369 Although the association of this *ESR1* polymorphism with the risk of developing erosive disease did
370 not survive after correction for multiple testing, we found that 3 *ESR1* haplotypes (*ESR1*_{CTATTTCTCA},
371 *ESR1*_{CTATTCTTCA}, and *ESR1*_{GTATTCTCTA}) were significantly associated with a decreased risk of having
372 erosive disease ($P=0.0094$, $P=0.0021$ and $P=0.0023$, respectively; Table 4). Interestingly, we also
373 found that the *ESR1*_{rs2881766GG} genotype or G allele weakly correlated with progesterone levels
374 ($P=0.0076$ and $P=0.0071$) and that the *ESR1*_{rs851984}, *ESR1*_{rs2077647}, *ESR1*_{rs2071454}, *ESR1*_{rs3798577} and
375 *ESR1*_{rs910416} variants mapped among histone marks in several cell types including osteoblasts and a
376 wide variety of immune cells. In addition, we found that the *ESR1*_{rs3798577} variant correlated with
377 TNF α and IL6 levels after the stimulation of human macrophages with LPS for 24h ($P=0.00083$ and
378 0.0011 ; Figure 2D and 2E). Even though at this point it was tempting to speculate that *ESR1* SNPs

379 might exert their effect on the risk of developing erosive disease through the modulation of
380 progesterone and progesterone-mediated immune responses, it is important to mention that none of
381 the associations between *ESR1* SNPs and progesterone or cytokine levels survived after correction
382 for multiple testing, which suggested a modest impact of the *ESR1* polymorphisms on the risk of
383 developing bone erosions.

384

385 Finally, we observed a RF effect modification of the *FCGR3A*_{rs396991} SNP to determine the risk of
386 developing bone erosions. Seronegative patients carrying the *FCGR3A*_{rs396991C} allele had a
387 significantly reduced chance of developing bone erosions (OR=0.45, 95%CI 0.24-0.85; $P=0.013$)
388 whereas an opposite but not significant effect was observed in seropositive patients (OR=1.18,
389 95%CI 0.76-1.81; $P=0.46$; $P_{\text{Interaction}}=0.028$; Table 3). Similar to the *CYP2C9* and *ESR2* SNPs, the
390 *FCGR3A*_{rs396991} variant did not show a significant effect modification by anti-CCP ($P_{\text{Interaction}}=0.85$)
391 suggesting that RF, rather than anti-CCP, is a driver factor influencing the impact of hormone-
392 related SNPs on disease progression in RA. Although the effect of this polymorphism on the risk of
393 developing bone erosions was not significant after multiple testing correction, we found that carriers
394 of the *FCGR3A*_{rs396991C} allele showed a significantly increased production of TNF α after stimulation
395 of macrophages with LPS for 24h ($P=1.97 \cdot 10^{-7}$; Figure 2F). Importantly, the association of the
396 *FCGR3A*_{rs396991C} allele with increased levels of TNF α in macrophages survived after correction for
397 multiple testing, which strongly suggests a functional effect of this variant to modulate macrophage-
398 mediated immune responses, which indeed might be a key factor influencing the risk of developing
399 erosive disease.

400

401 *Usefulness of steroid hormone-related SNPs to predict erosive disease*

402 As a whole, our data suggest that the attributable effect of the *ESR2*, *CYP2C9*, *ESR1* and *FCGR3A*
403 loci to modulate the risk of developing bone erosions in RA patients might be dependent on the
404 presence of either missense or intronic polymorphisms that affect the immune responses to a
405 greater or lesser extent. Considering the strength of the RF-specific associations found for SNPs

406 within *CYP2C9* and *ESR2* genes but also *ESR1*, *FCGR3A*, *CYP1B1*, *CYP3A4*, and *SHBG* loci, we
407 decided to assess whether SNPs within these loci could be useful to differentially predict disease
408 progression in seropositive and seronegative patients. Our results showed that the addition of 5
409 steroid hormone-related polymorphisms within the *ESR2* and *CYP2C9* but also *CYP1B1*, *CYP3A4*,
410 and *SHBG* loci to a model including demographic variables significantly improved the ability to
411 predict the appearance of bone erosions in seropositive patients ($AUC_{\text{Genetic}}=0.73$ vs.
412 $AUC_{\text{Reference}}=0.63$; $P=2.46 \cdot 10^{-8}$; Table 5) whereas no significant predictive value was found for these
413 SNPs in seronegative patients ($AUC_{\text{Genetic}}=0.61$ vs. $AUC_{\text{Demographic}}=0.59$; $P=0.36$; Figure 4). The
414 consistency of this predictive analysis was confirmed through a permutation test that showed that
415 none of the 50.000 permuted models for each group showed a better prediction capacity than the
416 genetic model (Average sorted $AUC=0.644$, $Z\text{-score}=6.79$ and $P_{Z\text{-score (50.000perm)}}=5.67 \cdot 10^{-12}$).

417

418 **DISCUSSION**

419 The present study reports, for the first time, both overall and RF-specific associations of steroid
420 hormone-related polymorphisms with the risk of developing erosive RA. The most relevant effect
421 was found for SNPs within *ESR2*, *CYP2C9* and *ESR1* genes. We found that seropositive RA
422 patients carrying the *ESR2*_{rs1271572T/T} and *CYP2C9*_{rs1799853T/T} genotypes had a significantly reduced
423 risk of developing bone erosions during the course of the disease whereas an opposite but not
424 significant effect was found in seronegative patients. It is worth mentioning that the association of
425 both SNPs with the risk of having erosive disease remained statistically significant after correction
426 for multiple testing, which points towards a relevant role of the *ESR2* and *CYP2C9* loci in
427 modulating disease progression in RA. Although the relatively small size of the replication
428 population hampered the validation of these associations according to a recessive model of
429 inheritance, we could confirm through a meta-analysis the RF-specific effect found for the
430 *ESR2*_{rs1271572} polymorphism on the risk of developing erosive disease. In support of a RF-specific
431 effect of these variants in determining the appearance of bone erosions, we found that seropositive
432 carriers of the *ESR2*_{C_GT_A} and *CYP2C9*_{A_T} haplotypes had a decreased risk to develop erosive RA

433 whereas no effect was detected in seronegative patients. In addition to these RF-specific effects,
434 we observed a significant overall association of 3 common haplotypes within the *ESR1* locus
435 (*ESR1*_{CTATTTTCTA}, *ESR1*_{CTATTCTTCA}, and *ESR1*_{GTATTCTCTA}) with a decreased risk of developing bone
436 erosions. These results emphasize the biological impact of *ESR2*, *ESR1* and *CYP2C9* variants on
437 the pathogenesis of RA and highlight the importance of considering RF as a modifying factor for
438 genetic association studies in RA. Given the complexity of the pathogenesis of RA, it is reasonable
439 to think that specific genetic predisposing markers may vary between different groups of patients⁵¹
440 and that the presence or absence of RF antibodies may reflect different underlying disease
441 mechanisms.

442

443 The *ESR2* and *ESR1* genes are located on chromosome 14q23.2 and 6q25.1 respectively and
444 encode the estrogen receptor beta (*ESRβ*) and alpha (*ESRα*) that are highly expressed in synovial
445 cells⁵² and bone⁵³ but also in most of the immune cells⁵⁴. Although a number of experimental
446 studies have shown that female RA patients have worse prognosis and higher disease activity and
447 health assessment questionnaire scores in comparison with male patients, it is also well established
448 that steroid hormones have both pro- and anti-inflammatory roles in RA. Although it has been
449 reported, for instance, that the activation of ESRs by estradiol (*E*₂) often leads to joint protection and
450 the maintenance of bone density (by inhibiting bone resorption)⁵⁵ and that the withdrawal of
451 estrogens drastically increases the severity of the disease (by promoting joint destruction, bone
452 erosions and physical disability)⁵⁶, it has been also reported that RA patients have high levels of
453 estrone in the synovial fluid compared to healthy individuals and that estrogens can also induce pro-
454 inflammatory responses through the activation of different mechanisms involving humoral
455 immunity⁵⁷, multiple transcription factors (such as *c/EBPβ*, *STAT-1*, *NFκB*) and oxidative stress
456 pathways (especially those involving *iNOs*)^{58,59}. Furthermore, it has been reported that estrogens
457 are able to promote pro-inflammatory pathways including B- and T-cell proliferation⁶⁰, thymocyte
458 maturation⁶¹, cell trafficking⁶² and the expression of specific adhesion molecules⁶⁰. Although the
459 existing paradox with respect to the immunomodulating role of steroid hormones in RA remain

460 unresolved, it seems to be reasonable to hypothesize that the presence of *ESR2* polymorphisms
461 that correlate either with *ESR2* mRNA expression levels may influence on the risk of developing
462 bone erosions in RA likely through the modulation of *ESR2*-dependent tolerogenic immune
463 responses. In addition, although the association of the *ESR2* and *ESR1* polymorphisms with serum
464 hormone levels or TNF and IL6 levels in stimulated macrophages did not remain significant after
465 correction for multiple testing, our functional findings were in agreement with the genetic results
466 suggesting a protective effect of *ESR2* polymorphisms and specific *ESR1* haplotypes on the risk of
467 developing erosive RA. In addition, our genetic and functional results were also concordant with
468 data of previous studies reporting that the presence of certain SNPs, microsatellites or even specific
469 haplotypes within estrogen receptor genes is associated with bone mineral density and influences
470 the risk of developing bone erosions^{63,64} affecting RA patients⁶⁵ but also subjects diagnosed with
471 other chronic inflammatory diseases⁶⁶ and bone degenerative diseases^{67,68}.

472

473 On the other hand, this study suggests, for the first time, that the *CYP2C9*_{rs1799853} polymorphism
474 might be involved in determining disease severity and progression in a RF-dependent manner. We
475 found that seropositive RA patients carrying of the *CYP2C9*_{rs1799853T/T} genotype had a significantly
476 decreased chance of developing erosive disease, whereas an opposite but not significant effect
477 was seen in seropositive patients. Importantly, the association of the *CYP2C9*_{rs1799853T/T} genotype
478 with a decreased risk of having bone erosions remained significant after correction for multiple
479 testing, which supported the notion of a relevant role of the *CYP2C9* gene in modulating disease
480 progression in RA. Although we could not validate the association of this marker with a decreased
481 risk of developing erosive disease due to the small size of the replication population, it is plausible
482 to hypothesize that the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP might determine disease progression in RA through
483 the modulation of hormone metabolism and hormone-dependent immune responses.

484

485 *CYP2C9* belongs to the *CYP2C* family, a gene cluster (*CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8*) located on
486 chromosome 10q23.3. Together with *CYP1A2* and *CYP3A4*, *CYP2C9* catalyzes hydroxylation of

487 estradiol (estradiol 2-hydroxylation)⁶⁹, a key process that allow the binding of 2-OHE₂ to ESR1 and
488 ESR2. At low concentrations, CYP2C9 is also implicated in the 17beta-hydroxy dehydrogenation of
489 estradiol creating estrone, which is one of the 3 natural estrogens with multiple immunomodulatory
490 actions. Given that the *CYP2C9*_{rs1799853} SNP is an exonic variant that alters the amino acid
491 sequence of the protein (Arg144Cys) and appears to decrease the activity of the enzyme, we might
492 hypothesize that the presence of this SNP determinate vitamin D3 levels and, consequently, vitamin
493 D3-mediated immune responses and disease progression. However, we only found a significant
494 correlation of this SNP with vitamin D3 in women whereas no effect was seen in men. These
495 results, together with those reporting that carriers of the *CYP2C9*_{rs1799853T} allele have an increased
496 production of IL1 β after the stimulation of PBMCs or whole blood with LPS or PHA, suggest that the
497 protective effect attributed to this coding variant might not only depend on vitamin D3 levels but
498 other factors such as RF or even other stimuli or substrates. In this regard, our team has reported
499 that the *CYP2C9*_{rs1799853} polymorphism is strongly associated with poor response to anti-TNF drugs
500 in RA⁷⁰, suggesting that this missense variant might modulate the strength of immune responses
501 through the regulation of the metabolism of endogenous compounds but also compounds
502 administered exogenously.

503

504 Considering the noticeable impact of the *ESR2* and *CYP2C9* SNPs on the risk of developing
505 erosive disease in seropositive patients but also the functional implication of SNPs within the
506 *CYP2C9*, *ESR2*, *ESR1* and *FCGR3A* loci in modulating hormone levels and/or immune responses,
507 we decided to assess if the presence of steroid hormone-related SNPs could be useful to reliably
508 predict the appearance of bone erosions in seropositive and seronegative patients separately. To
509 do that, we built a genetic model including demographic variables and the 8 SNPs that were
510 consistently associated with the risk of developing bone erosions in seropositive patients. After
511 removing the SNPs that were not significantly associated with erosive disease in the model, we
512 obtained a model including 5 SNPs within the *ESR2* and *CYP2C9* but also *CYP1B1*, *CYP3A4*, and
513 *SHBG* loci that significantly improved the ability to predict the risk of developing erosive disease

514 when compared with a reference model including demographic variables. The predictive capacity of
515 these SNPs was restricted to seropositive patients since the addition of the same SNPs (or any
516 other genetic marker) to a model built with demographic variables in seronegative patients did not
517 show any predictive value. The predictive ability of the genetic model in seropositive patients was
518 consistent as no similar models were found after performing a 50.000 permutation test. These
519 results suggest that steroid hormone-related SNPs alone or in combination with other clinical and
520 genetic markers might help to improve the ability to predict the appearance of bone erosions in
521 seropositive patients (~70% of RA patients). Additional studies including these and other genetic
522 and clinical markers are urgently needed to improve our ability to predict disease progression in RA.
523

524 This study has strengths and weaknesses. The strengths of this study include a relatively large and
525 well-characterized population and the meta-analyses conducted considering results from the
526 DREAM registry. In the discovery population, we had 80% of power to detect an odds ratio of 1.68
527 ($\alpha=0.00074$) for a SNP with a frequency of 0.25, which underlined the feasibility of the study design.
528 Another important strength of this study is the development of cytokine stimulation experiments and
529 the measurement of seven serum steroid hormones in a large cohort of healthy subjects, which
530 allowed us to investigate the functional role of the most interesting markers in modulating immune
531 responses but also to test their impact on determining steroid hormone levels. A drawback of this
532 study is the relatively small size of the replication population that hampered the validation of one of
533 the most interesting associations found for steroid hormone-related SNPs. In addition, given the
534 cross-sectional nature of our study, we have intrinsic limitations such as a possible bias due to
535 variations in treatments and follow-up time among study participants.

536

537 **CONCLUSION**

538 In conclusion, this candidate gene association study suggests, for the first time, that the presence of
539 *ESR2*, *CYP2C9*, *ESR1* and *FCGR3A* SNPs or haplotypes influence the risk of developing bone
540 erosions in RA. This study also shows that the functional effect found for SNPs or haplotypes within

541 *ESR2*, *CYP2C9* and *FCGR3A* SNPs was dependent on the RF status and that genotyping of
542 hormone-related SNPs might help to reliably predict disease progression in seropositive patients.

543

544 **ACKNOWLEDGEMENTS**

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

549

550 **FUNDING**

551 This study was supported by a research grant from FIBAO foundation.

552

553 **COMPETING INTEREST**

554 None.

555

556 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

557 RC and JS designed the study and drafted the manuscript. JSM, LC, CBL and ARR were
558 responsible for genotyping of the different populations. RC, AAB, HC, AG, EPP, AGU, AE, MF, EC-
559 S, MALN, MJ, JEF, MJHC and JSP coordinated the sample collection and HC, JSC and MJSP were
560 involved in the records review and data acquisition. RH, OB, RTN-M, YL, MGN were implicated in
561 providing functional data. MM-B and JS did the statistical data analysis. All authors contributed to,
562 seen, and approved the final version of the manuscript.

563

564 **ETHICS APPROVAL**

565 The study was approved by the ethical review committee of each participant institution (Virgen de
566 las Nieves University Hospital, Granada, Spain; Reina Sofia Hospital, Córdoba, Spain; University
567 Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; Biobanco-IMM,

568 Lisbon Academic Medical Centre, Portugal. Cytokine stimulation experiments and hormone analysis
569 were approved by the Arnhem-Nijmegen Ethical Committee.
570

571 REFERENCES

- 572 1 Brooks, P. M. The burden of musculoskeletal disease--a global perspective. *Clin Rheumatol* **25**,
573 778-781, (2006).
- 574 2 Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to
575 understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*
576 **30**, 1205-1213, (1987).
- 577 3 Wellcome Trust Case Control, C. *et al.* Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in
578 four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature genetics* **39**, 1329-1337, (2007).
- 579 4 Lettre, G. & Rioux, J. D. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies.
580 *Hum Mol Genet* **17**, R116-121, (2008).
- 581 5 Okada, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.
582 *Nature* **506**, 376-381, (2014).
- 583 6 Cuppen, B. V. *et al.* Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis: a systematic
584 review with a focus on clinical applicability. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 826-839, (2016).
- 585 7 Umicevic Mirkov, M. *et al.* Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in
586 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **72**, 1375-1381, (2013).
- 587 8 Acosta-Colman, I. *et al.* GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLCO1C1
588 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* **14**, 727-734,
589 (2013).
- 590 9 Cui, J. *et al.* Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as
591 a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet* **9**, e1003394,
592 (2013).

- 593 10 Plant, D. *et al.* Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis
594 factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at
595 seven loci. *Arthritis Rheum* **63**, 645-653, (2011).
- 596 11 Liu, C. *et al.* Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated
597 with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol Med* **14**, 575-581,
598 (2008).
- 599 12 Marinou, I., Maxwell, J. R. & Wilson, A. G. Genetic influences modulating the radiological
600 severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**, 476-482, (2010).
- 601 13 Maxwell, J. R. *et al.* Rheumatoid arthritis-associated polymorphisms at 6q23 are associated
602 with radiological damage in autoantibody-positive RA. *J Rheumatol* **39**, 1781-1785, (2012).
- 603 14 Scott, I. C. *et al.* Do Genetic Susceptibility Variants Associate with Disease Severity in Early
604 Active Rheumatoid Arthritis? *J Rheumatol* **42**, 1131-1140, (2015).
- 605 15 Klareskog, L. *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger
606 HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination.
607 *Arthritis Rheum* **54**, 38-46, (2006).
- 608 16 Symmons, D. P. *et al.* Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the
609 development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control
610 study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* **40**, 1955-1961, (1997).
- 611 17 Mahdi, H. *et al.* Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to
612 citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nature genetics* **41**, 1319-
613 1324, (2009).
- 614 18 Mathsson, L., Lampa, J., Mullazehi, M. & Ronnelid, J. Immune complexes from rheumatoid
615 arthritis synovial fluid induce FcγRIIIa dependent and rheumatoid factor correlated
616 production of tumour necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res*
617 *Ther* **8**, R64, (2006).
- 618 19 Newkirk, M. M. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol* **104**, 1-13,
619 (2002).

- 620 20 Dorner, T., Egerer, K., Feist, E. & Burmester, G. R. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin*
621 *Rheumatol* **16**, 246-253, (2004).
- 622 21 Blom, A. B. *et al.* Increased expression of Fcγ receptors II and III on macrophages of
623 rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and
624 matrix metalloproteinase. *Arthritis Rheum* **48**, 1002-1014, (2003).
- 625 22 Blom, A. B. *et al.* Fc gamma R expression on macrophages is related to severity and chronicity
626 of synovial inflammation and cartilage destruction during experimental immune-complex-
627 mediated arthritis (ICA). *Arthritis Res* **2**, 489-503, (2000).
- 628 23 van Lent, P. L. *et al.* Role of Fc receptor gamma chain in inflammation and cartilage damage
629 during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 740-752, (2000).
- 630 24 Karlson, E. W., Mandl, L. A., Hankinson, S. E. & Grodstein, F. Do breast-feeding and other
631 reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses'
632 Health Study. *Arthritis Rheum* **50**, 3458-3467, (2004).
- 633 25 Doran, M. F., Crowson, C. S., O'Fallon, W. M. & Gabriel, S. E. The effect of oral contraceptives
634 and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study.
635 *J Rheumatol* **31**, 207-213, (2004).
- 636 26 Walitt, B. *et al.* Effects of postmenopausal hormone therapy on rheumatoid arthritis: the
637 women's health initiative randomized controlled trials. *Arthritis Rheum* **59**, 302-310, (2008).
- 638 27 Hernandez-Avila, M. *et al.* Exogenous sex hormones and the risk of rheumatoid arthritis.
639 *Arthritis Rheum* **33**, 947-953, (1990).
- 640 28 Orellana, C. *et al.* Postmenopausal hormone therapy and the risk of rheumatoid arthritis: results
641 from the Swedish EIRA population-based case-control study. *Eur J Epidemiol* **30**, 449-457,
642 (2015).
- 643 29 Salliot, C., Bombardier, C., Saraux, A., Combe, B. & Dougados, M. Hormonal replacement
644 therapy may reduce the risk for RA in women with early arthritis who carry HLA-DRB1 *01
645 and/or *04 alleles by protecting against the production of anti-CCP: results from the ESPOIR
646 cohort. *Ann Rheum Dis* **69**, 1683-1686, (2010).

- 647 30 Adorini, L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell*
648 *Immunol* **233**, 115-124, (2005).
- 649 31 Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C. & Li, D. J. Estrogen enhances the functions of
650 CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone
651 resorption in vitro. *Cell Mol Immunol* **8**, 50-58, (2011).
- 652 32 Lelu, K. *et al.* Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-
653 mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental
654 autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **187**, 2386-2393, (2011).
- 655 33 Tai, P. *et al.* Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol* **214**,
656 456-464, (2008).
- 657 34 Kramer, P. R., Winger, V. & Kramer, S. F. 17beta-Estradiol utilizes the estrogen receptor to
658 regulate CD16 expression in monocytes. *Mol Cell Endocrinol* **279**, 16-25, (2007).
- 659 35 Fossati, G., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Insoluble and soluble immune complexes
660 activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses
661 induced by priming with cytokines. *Ann Rheum Dis* **61**, 13-19, (2002).
- 662 36 Robinson, J., Watson, F., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Activation of neutrophil reactive-
663 oxidant production by synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. Soluble and
664 insoluble immunoglobulin aggregates activate different pathways in primed and unprimed cells.
665 *Biochem J* **286 (Pt 2)**, 345-351, (1992).
- 666 37 Robinson, J. J., Watson, F., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Stimulation of neutrophils by
667 insoluble immunoglobulin aggregates from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.
668 *Eur J Clin Invest* **22**, 314-318, (1992).
- 669 38 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the
670 classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-324, (1988).
- 671 39 van Gestel, A. M. *et al.* Development and validation of the European League Against
672 Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary

673 American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League
674 Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* **39**, 34-40, (1996).

675 40 Caliz, R. *et al.* Gender-specific effects of genetic variants within Th1 and Th17 cell-mediated
676 immune response genes on the risk of developing rheumatoid arthritis. *PloS one* **8**, e72732,
677 (2013).

678 41 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within immune-modulating genes influence the risk of
679 developing rheumatoid arthritis and anti-TNF drug response: a two-stage case-control study.
680 *Pharmacogenet Genomics* **25**, 432-443, (2015).

681 42 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid
682 arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study. *Pharmacogenet Genomics* **25**,
683 323-333, (2015).

684 43 Schaid, D. J., Rowland, C. M., Tines, D. E., Jacobson, R. M. & Poland, G. A. Score tests for
685 association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American journal*
686 *of human genetics* **70**, 425-434, (2002).

687 44 Nyholt, D. R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in
688 linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* **74**, 765-769, (2004).

689 45 Chen, B., Wilkening, S., Drechsel, M. & Hemminki, K. SNP_tools: A compact tool package for
690 analysis and conversion of genotype data for MS-Excel. *BMC research notes* **2**, 214, (2009).

691 46 Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and
692 haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263-265, (2005).

693 47 Gabriel, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* **296**,
694 2225-2229, (2002).

695 48 Li, Y. *et al.* A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in
696 Humans. *Cell* **167**, 1099-1110 e1014, (2016).

697 49 Schirmer, M. *et al.* Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production
698 Capacity. *Cell* **167**, 1897, (2016).

699 50 Ter Horst, R. *et al.* Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine
700 Responses. *Cell* **167**, 1111-1124 e1113, (2016).

701 51 Szodoray, P. *et al.* Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic
702 and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun*
703 *Rev* **9**, 140-143, (2010).

704 52 Cutolo, M. *et al.* Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human
705 synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 820-827, (1996).

706 53 Bord, S., Horner, A., Beavan, S. & Compston, J. Estrogen receptors alpha and beta are
707 differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2309-2314,
708 (2001).

709 54 Cutolo, M. *et al.* Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and
710 CD8+, CD29+, CD45RO+ T lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*
711 **36**, 1087-1097, (1993).

712 55 Recker, R. R., Davies, K. M., Dowd, R. M. & Heaney, R. P. The effect of low-dose continuous
713 estrogen and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in elderly women. A
714 randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **130**, 897-904, (1999).

715 56 Kuiper, S. *et al.* Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid
716 arthritis. *J Rheumatol* **28**, 1809-1816, (2001).

717 57 Cutolo, M. *et al.* New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **21**, 687-
718 690, (2003).

719 58 Dai, R., Phillips, R. A., Karpuzoglu, E., Khan, D. & Ahmed, S. A. Estrogen regulates
720 transcription factors STAT-1 and NF-kappaB to promote inducible nitric oxide synthase and
721 inflammatory responses. *J Immunol* **183**, 6998-7005, (2009).

722 59 Wihlen, B., Ahmed, S., Inzunza, J. & Matthews, J. Estrogen receptor subtype- and promoter-
723 specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription. *Mol Cancer Res* **7**,
724 977-986, (2009).

- 725 60 Da Silva, J. A. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann N*
726 *Y Acad Sci* **876**, 102-117; discussion 117-108, (1999).
- 727 61 Erlandsson, M. C., Ohlsson, C., Gustafsson, J. A. & Carlsten, H. Role of oestrogen receptors
728 alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus.
729 *Immunology* **103**, 17-25, (2001).
- 730 62 Mo, R. *et al.* Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J*
731 *Immunol* **174**, 6023-6029, (2005).
- 732 63 Kobayashi, S. *et al.* Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen
733 receptor gene. *J Bone Miner Res* **11**, 306-311, (1996).
- 734 64 Willing, M. *et al.* Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D
735 receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res* **13**, 695-705, (1998).
- 736 65 Masi, L. *et al.* The role of osteoprotegerin (OPG) and estrogen receptor (ER-alpha) gene
737 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Clin Cases Miner Bone Metab* **4**, 156-160, (2007).
- 738 66 Lian, K. *et al.* Estrogen receptor alpha genotype is associated with a reduced prevalence of
739 radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 972-
740 978, (2007).
- 741 67 Albagha, O. M., McGuigan, F. E., Reid, D. M. & Ralston, S. H. Estrogen receptor alpha gene
742 polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United
743 Kingdom. *J Bone Miner Res* **16**, 128-134, (2001).
- 744 68 Sano, M. *et al.* Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with
745 osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 378-383, (1995).
- 746 69 Van Booven, D. *et al.* Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* **20**, 277-
747 281, (2010).
- 748 70 Canet, L. M. *et al.* Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci
749 influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*
750 *J*, (2018).

751
752

753

754 **Table 1.** Demographic and clinical characteristics of RA patients (discovery and replication cohorts).

| | Discovery Population (n=816) | Replication Population (n=436) |
|--|---|---|
| Demographic characteristics | | |
| Age (years) | 59.32 ± 13.11 | 53.59 ± 12.84 |
| Sex ratio (female/male) | 3.74 (644/172) | 2.06 (294/143) |
| Clinical assessment | | |
| Percentage of patients with RF positivity* | 571 (70.58) | 328 (77.72) |
| Percentage of ACPA-positive patients* | 490 (72.80) | 90 (58.06) |
| DAS28 at baseline | 5.63 ± 2.40 | 5.24 ± 1.27 |
| Disease follow-up (years) | 18.30 ± 9.34 | 9.00 ± 9.87 |
| Percentage of RA patients having erosive disease | 567 (69.49) | 307 (70.41) |
| Percentage of RA patients with biologic treatments | 632 (77.45) | 436 (100.00) |
| DMARDs | | |
| Methotrexate ^o | 603 (79.24) | 314 (75.48) |
| First biological treatment | | |
| Infliximab (%) | 271 (42.88) | 106 (24.31) |
| Etanercept (%) | 176 (27.85) | 101 (23.16) |
| Adalimumab (%) | 157 (24.84) | 229 (52.52) |
| Golimumab (%) | 11 (1.74) | - |
| Abatacept (%) | 5 (0.79) | - |
| Tocilizumab (%) | 4 (0.63) | - |
| Rituximab (%) | 8 (1.27) | - |

781

782 Data are means ± standard deviation or n (%). Abbreviations: RF, rheumatoid factor; ACPA: anti-citrullinated protein antibodies; DAS28,
783 disease activity score; DMARDs, disease-modifying anti-rheumatic drugs.

784 * RF and anti-CCP data were available in 809 and 673 RA patients in the discovery population, respectively.

785 * RF and anti-CCP data were available in 328 and 155 RA patients in the replication population, respectively.

786 ^o Information about methotrexate treatment was available in 761 and 416 patients in the discovery and replication populations,
787 respectively.

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802 **Table 2.** Selected SNPs within steroid hormone-related genes.

| Gene | Chr. | dbSNP rs# | Nucleotide substitution | Effect-allele | Amino acid substitution |
|----------------|------|------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
| <i>CYP1A1</i> | 15 | rs1799814 | A/C | A | T461N |
| <i>CYP1A2</i> | 15 | rs762551 | A/C | C | intronic |
| <i>CYP1B1</i> | 2 | rs1800440 | A/G | G | N453T |
| <i>CYP1B1</i> | 2 | rs1056836 | C/G | G | 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 | C | 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 | A/G | G | 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 | C/T | T | intronic |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs2881766 | G/T | G | 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 | C/T | C | intronic |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs2234693 | C/T | C | Intronic |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs9340799 | A/G | G | intronic |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs1801132 | C/G | G | P325P |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs3798577 | C/T | C | 3'-UTR |
| <i>ESR1</i> | 6 | rs910416 | C/T | T | Near gene |
| <i>ESR2</i> | 14 | rs1255998 | C/G | G | 3'-UTR |
| <i>ESR2</i> | 14 | rs928554 | A/G | G | 3'-UTR |
| <i>ESR2</i> | 14 | rs4986938 | T/C | T | 3'-UTR |
| <i>ESR2</i> | 14 | rs1271572 | G/T | T | Near gene |
| <i>FCGR2A</i> | 1 | rs1801274 | A/G | G | H131R |
| <i>FCGR3A</i> | 1 | rs396991 | A/C | C | V158F |
| <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>PGR</i> | 11 | rs1042838 | C/A | A | V660L |
| <i>PGR</i> | 11 | rs1379130 | A/G | A | G393G |
| <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 |

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

Table 3. Overall and RF-specific associations of estrogen-related polymorphisms and risk of developing erosive disease.

| Gene | SNP ID | Effect allele | Overall (n=816) | | RF-positive patients (n=571) | | RF-negative patients (n=238) | | <i>P</i> _{Interaction} |
|----------------|------------|---------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|---------------------------------|
| | | | OR (95% CI) [†] | <i>P</i> | OR (95% CI) [†] | <i>P</i> | OR (95% CI) [†] | <i>P</i> | |
| <i>CYP1A1</i> | rs1799814 | A | 0.85 (0.52-1.39) | 0.52 | 0.82 (0.43-1.54) | 0.53 | 0.98 (0.44-2.18) | 0.96 | 0.54 |
| <i>CYP1A2</i> | rs762551 | C | 0.91 (0.66-1.25) | 0.57 | 0.72 (0.48-1.09) | 0.12 | 1.37 (0.80-2.34) | 0.25 | 0.059 |
| <i>CYP1B1</i> | rs1800440 | G | 1.06 (0.76-1.46) | 0.74 | 1.12 (0.74-1.69) | 0.60 | 0.97 (0.55-1.69) | 0.90 | 0.50 |
| <i>CYP1B1</i> | rs1056836 | G | 0.92 (0.64-1.32) | 0.66 | 1.04 (0.67-1.63) | 0.85 | 0.66 (0.34-1.26) | 0.21 | 0.35 |
| <i>CYP1B1</i> | rs10012 | G | 0.62 (0.37-1.04) [§] | 0.071 | 0.42 (0.23-0.76)[§] | 0.004 | 1.70 (0.56-5.17) [§] | 0.35 | 0.031 |
| <i>CYP2C9</i> | rs1799853 | T | 0.45 (0.20-1.02) [§] | 0.056 | 0.16 (0.06-0.46)[§] | 0.0007 | 2.71 (0.53-13.8) [§] | 0.23 | 0.003 |
| <i>CYP2C9</i> | rs1057910 | C | 1.68 (0.98-2.89) | 0.059 | 2.63 (1.15-6.03) | 0.012 | 1.28 (0.58-2.81) | 0.54 | 0.20 |
| <i>CYP2C19</i> | rs12248560 | T | 1.04 (0.75-1.44) | 0.83 | 1.09 (0.72-1.65) | 0.70 | 0.96 (0.54-1.70) | 0.89 | 0.55 |
| <i>CYP2C19</i> | rs4244285 | A | 1.00 (0.69-1.44) | 0.99 | 1.02 (0.64-1.61) | 0.94 | 0.90 (0.47-1.70) | 0.74 | 0.79 |
| <i>CYP3A4</i> | rs2740574 | G | 1.57 (0.90-2.74) | 0.11 | 3.12 (1.29-7.55) | 0.004 | 0.70 (0.29-1.66) | 0.42 | 0.021 |
| <i>CYP3A4</i> | rs11773597 | C | 1.19 (0.77-1.84) | 0.43 | 1.33 (0.74-2.38) | 0.35 | 1.00 (0.50-2.03) | 0.99 | 0.65 |
| <i>CYP17A1</i> | rs743572 | G | 0.92 (0.66-1.28) | 0.63 | 0.99 (0.65-1.50) | 0.97 | 0.82 (0.46-1.45) | 0.49 | 0.62 |
| <i>ESR1</i> | rs851984 | T | 1.07 (0.78-1.46) | 0.68 | 0.82 (0.55-1.24) | 0.35 | 1.56 (0.91-2.68) | 0.10 | 0.078 |
| <i>ESR1</i> | rs2881766 | G | 1.00 (0.72-1.39) | 0.99 | 1.08 (0.71-1.65) | 0.71 | 0.83 (0.47-1.48) | 0.54 | 0.47 |
| <i>ESR1</i> | rs2071454 | G | 0.96 (0.65-1.42) | 0.82 | 1.06 (0.65-1.75) | 0.81 | 0.75 (0.38-1.49) | 0.42 | 0.41 |
| <i>ESR1</i> | rs2077647 | G | 0.92 (0.65-1.30) | 0.64 | 0.70 (0.45-1.09) | 0.11 | 1.46 (0.81-2.63) | 0.21 | 0.030 |
| <i>ESR1</i> | rs827421 | C | 0.95 (0.67-1.33) | 0.75 | 0.80 (0.52-1.25) | 0.33 | 1.21 (0.66-2.20) | 0.54 | 0.18 |
| <i>ESR1</i> | rs2234693 | C | 1.10 (0.78-1.55) | 0.58 | 0.97 (0.62-1.51) | 0.89 | 1.33 (0.73-2.40) | 0.35 | 0.32 |
| <i>ESR1</i> | rs9340799 | G | 0.97 (0.71-1.34) | 0.87 | 0.78 (0.52-1.17) | 0.23 | 1.42 (0.82-2.45) | 0.21 | 0.052 |
| <i>ESR1</i> | rs1801132 | G | 0.71 (0.52-0.97) | 0.034 | 0.85 (0.57-1.27) | 0.44 | 0.53 (0.31-0.92) | 0.025 | 0.13 |
| <i>ESR1</i> | rs3798577 | C | 1.21 (0.87-1.68) | 0.27 | 1.39 (0.92-2.10) | 0.12 | 1.12 (0.63-2.01) | 0.69 | 0.50 |
| <i>ESR1</i> | rs910416 | T | 0.84 (0.59-1.19) | 0.33 | 0.75 (0.47-1.18) | 0.21 | 0.91 (0.51-1.61) | 0.74 | 0.68 |
| <i>ESR2</i> | rs1255998 | G | 0.92 (0.64-1.33) | 0.67 | 1.07 (0.66-1.72) | 0.78 | 0.72 (0.39-1.34) | 0.30 | 0.44 |
| <i>ESR2</i> | rs928554 | G | 0.78 (0.52-1.17) [§] | 0.23 | 0.58 (0.35-0.96)[§] | 0.035 | 1.39 (0.70-2.78) [§] | 0.35 | 0.032 |
| <i>ESR2</i> | rs4986938 | T | 1.09 (0.79-1.51) | 0.59 | 1.41 (0.93-2.11) | 0.10 | 0.74 (0.42-1.29) | 0.29 | 0.068 |
| <i>ESR2</i> | rs1271572 | T | 0.55 (0.37-0.82)[§] | 0.004 | 0.38 (0.23-0.63)[§] | 0.0002 | 1.08 (0.54-2.14) [§] | 0.83 | 0.018 |
| <i>FCGR2A</i> | rs1801274 | G | 1.04 (0.72-1.51) | 0.82 | 1.17 (0.74-1.86) | 0.50 | 0.83 (0.43-1.61) | 0.58 | 0.33 |
| <i>FCGR3A</i> | rs396991 | C | 0.90 (0.64-1.27) | 0.56 | 1.18 (0.76-1.81) | 0.46 | 0.45 (0.24-0.85) | 0.013 | 0.028 |
| <i>GSTP1</i> | rs1695 | G | 1.05 (0.77-1.44) | 0.76 | 1.16 (0.77-1.75) | 0.47 | 0.70 (0.41-1.21) | 0.20 | 0.26 |
| <i>GSTP1</i> | rs1138272 | T | 1.32 (0.77-2.25) | 0.31 | 1.70 (0.83-3.46) | 0.13 | 0.71 (0.28-1.77) | 0.46 | 0.24 |
| <i>HSD17B1</i> | rs605059 | T | 1.12 (0.79-1.59) | 0.54 | 1.24 (0.80-1.92) | 0.33 | 1.12 (0.59-2.12) | 0.74 | 0.82 |
| <i>NR1I2</i> | rs2276706 | A | 1.01 (0.74-1.40) | 0.93 | 0.96 (0.64-1.43) | 0.83 | 1.18 (0.68-2.06) | 0.55 | 0.47 |
| <i>NR1I2</i> | rs1464603 | C | 1.16 (0.85-1.59) | 0.35 | 1.14 (0.76-1.69) | 0.53 | 1.45 (0.84-2.49) | 0.18 | 0.54 |
| <i>NR1I2</i> | rs6785049 | G | 0.92 (0.66-1.27) | 0.60 | 0.95 (0.63-1.43) | 0.81 | 1.03 (0.58-1.84) | 0.92 | 0.93 |
| <i>NR1I2</i> | rs2276707 | T | 1.03 (0.73-1.45) | 0.87 | 0.80 (0.51-1.23) | 0.31 | 1.62 (0.90-2.89) | 0.11 | 0.064 |
| <i>NR1I2</i> | rs1054191 | A | 0.83 (0.59-1.17) | 0.30 | 1.02 (0.65-1.58) | 0.94 | 0.58 (0.32-1.06) | 0.076 | 0.12 |
| <i>PGR</i> | rs1042838 | A | 0.76 (0.53-1.08) | 0.13 | 0.74 (0.47-1.15) | 0.18 | 0.86 (0.46-1.62) | 0.64 | 0.99 |
| <i>PGR</i> | rs1379130 | A | 0.92 (0.66-1.26) | 0.59 | 1.02 (0.68-1.53) | 0.93 | 0.79 (0.46-1.37) | 0.40 | 0.59 |
| <i>PGR</i> | rs518162 | A | 1.11 (0.75-1.64) | 0.62 | 1.41 (0.83-2.39) | 0.21 | 0.64 (0.33-1.25) | 0.19 | 0.092 |
| <i>SHBG</i> | rs6259 | A | 1.22 (0.83-1.78) | 0.31 | 1.87 (1.11-3.14) | 0.015 | 0.66 (0.35-1.23) | 0.19 | 0.006 |
| <i>SULT1A1</i> | rs9282861 | A | 1.04 (0.76-1.43) | 0.79 | 0.86 (0.58-1.29) | 0.46 | 1.38 (0.80-2.39) | 0.25 | 0.13 |

807

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

809 Data on RF was available in 511 RA patients. Estimates were adjusted for age, sex and country of origin. *P*<0.05 in bold.

810 [†] Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.

811 [§] Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.

812

813

814

815 **Table 4.** Haplotype association analysis for erosive disease in RA patients stratified by RF.

| ESR1 | RA patients (n=816) | | | RF+patients (n=571) | | | RF- patients (n=238) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|------------------------|----------|----------|------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|---------------------------|--------------------|--------|---------------------------|--------------------|--------|---------------------------|--------------------|------|
| | rs9340799 | rs910416 | rs851984 | rs827421 | rs3798577 | rs2881766 | rs2234693 | rs2077647 | rs2071454 | rs1801132 | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P | |
| 1 | C | T | A | T | C | T | C | T | C | T | C | 1.00 | --- | 0.0822 | 1.00 | --- | 0.0996 | 1.00 | --- | |
| 2 | C | T | G | C | T | C | C | T | C | T | G | 0.0680 | 0.42 (0.17 - 1.06) | 0.065 | 0.0750 | 0.54 (0.20 - 1.50) | 0.24 | 0.0358 | 0.77 (0.12 - 5.01) | 0.78 |
| 3 | C | T | A | T | T | C | C | A | C | A | 0.0462 | 0.36 (0.11 - 1.20) | 0.096 | 0.0537 | 1.69 (0.32 - 8.86) | 0.53 | 0.0115 | 0.09 (0.00 - 1.73) | 0.11 | |
| 4 | C | T | G | C | T | C | C | C | C | C | 0.0434 | 0.82 (0.24 - 2.78) | 0.74 | 0.0457 | 0.89 (0.23 - 3.36) | 0.86 | 0.0331 | 0.86 (0.08 - 9.47) | 0.9 | |
| 5 | C | T | A | T | T | C | T | A | A | A | 0.0432 | 0.25 (0.09 - 0.71) | 0.0094 | 0.0449 | 0.10 (0.03 - 0.40) | 0.001 | 0.0421 | 0.40 (0.07 - 2.36) | 0.32 | |
| 6 | G | T | A | T | T | C | T | A | A | A | 0.0405 | 0.58 (0.21 - 1.62) | 0.3 | 0.0367 | 0.75 (0.19 - 3.00) | 0.69 | 0.0324 | 0.48 (0.10 - 2.27) | 0.35 | |
| 7 | C | T | A | T | T | T | T | A | A | A | 0.0362 | 0.41 (0.13 - 1.26) | 0.12 | 0.0420 | 0.32 (0.08 - 1.33) | 0.12 | 0.0501 | 3.78 (0.51 - 28.1) | 0.2 | |
| 8 | C | T | G | C | T | T | C | T | T | G | 0.0349 | 1.35 (0.32 - 5.68) | 0.68 | 0.0421 | 0.59 (0.17 - 2.07) | 0.41 | 0.0123 | 0.06 (0.00 - 2.91) | 0.16 | |
| 9 | C | T | A | T | T | T | C | A | A | A | 0.0324 | 3.92 (0.48 - 32.0) | 0.2 | 0.0304 | 0.82 (0.12 - 5.42) | 0.83 | 0.0313 | 0.23 (0.03 - 1.74) | 0.16 | |
| 10 | C | T | A | T | C | T | C | A | A | A | 0.0301 | 0.12 (0.03 - 0.47) | 0.0021 | 0.0271 | 1.04 (0.16 - 6.62) | 0.96 | 0.0398 | 0.02 (0.00 - 0.24) | 0.0033 | |
| 11 | C | T | G | C | T | C | T | C | T | C | 0.0283 | 0.21 (0.07 - 0.70) | 0.011 | 0.0299 | 0.23 (0.06 - 0.88) | 0.033 | 0.0244 | 4.16 (0.27 - 63.2) | 0.31 | |
| 12 | C | T | A | T | T | C | T | T | A | A | 0.0262 | 4.43 (0.48 - 40.8) | 0.19 | 0.0187 | na (na-na) | na | 0.0218 | na (na-na) | na | |
| 13 | C | T | A | T | G | T | T | C | T | A | 0.0248 | 0.69 (0.22 - 2.13) | 0.52 | 0.0278 | 0.49 (0.13 - 1.83) | 0.29 | --- | na (na-na) | na | |
| 14 | C | T | G | C | T | C | T | C | T | C | 0.0238 | 1.03 (0.26 - 4.03) | 0.97 | 0.0229 | 0.24 (0.05 - 1.08) | 0.064 | --- | na (na-na) | na | |
| 15 | C | G | G | C | G | C | C | T | A | A | 0.0212 | 0.95 (0.27 - 3.31) | 0.93 | 0.0252 | 1.06 (0.25 - 4.44) | 0.94 | --- | na (na-na) | na | |
| 16 | C | T | G | C | T | C | C | C | G | G | 0.0210 | 1.10 (0.16 - 7.51) | 0.92 | 0.0161 | 1.49 (0.06 - 34.3) | 0.80 | 0.0541 | 0.74 (0.16 - 3.40) | 0.7 | |
| 17 | C | T | A | T | T | C | T | C | T | A | 0.0190 | 0.34 (0.05 - 2.19) | 0.26 | 0.0281 | 0.18 (0.04 - 0.82) | 0.026 | 0.0179 | 0.35 (0.01 - 11.36) | 0.56 | |
| 19 | G | T | G | C | T | C | C | C | G | G | 0.0162 | 0.26 (0.07 - 1.01) | 0.052 | --- | na (na-na) | na | --- | na (na-na) | na | |
| 18 | C | T | G | C | T | C | C | T | T | G | 0.0152 | 0.15 (0.03 - 0.81) | 0.027 | --- | na (na-na) | na | 0.0348 | 0.86 (0.11 - 6.89) | 0.89 | |
| 20 | G | T | A | T | T | C | T | C | A | A | 0.0147 | 0.14 (0.03 - 0.75) | 0.022 | 0.0196 | 0.12 (0.02 - 0.60) | 0.010 | 0.0157 | 0.38 (0.03 - 4.93) | 0.46 | |
| 21 | G | T | A | T | T | C | T | C | T | A | 0.0130 | 0.07 (0.01 - 0.38) | 0.0023 | --- | na (na-na) | na | 0.0259 | 0.24 (0.04 - 1.36) | 0.11 | |
| CYP2C9 | RA patients (n=816) | | | RF+patients (n=571) | | | RF- patients (n=238) | | | | | | | | | | | | | |
| rs1799853 | rs1057910 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | A | C | | | | | | | | | 0.7742 | 1.00 | --- | 0.7755 | 1.00 | --- | 0.7644 | 1.00 | --- | |
| 2 | A | T | | | | | | | | | 0.1660 | 0.72 (0.54 - 0.96) | 0.024 | 0.1706 | 0.61 (0.43 - 0.88) | 0.0075 | 0.1597 | 0.87 (0.53 - 1.42) | 0.57 | |
| 3 | C | C | | | | | | | | | 0.0593 | 1.48 (0.89 - 2.45) | 0.13 | 0.053 | 2.09 (0.96 - 4.56) | 0.063 | 0.0759 | 1.21 (0.60 - 2.44) | 0.6 | |

| ESR2 | rs1255998 | | | rs1271572 | | | rs4986938 | | | rs928554 | | | RA patients (n=816) | | | RF+ patients (n=571) | | | RF- patients (n=238) | | |
|------|-----------|---|---|-----------|---|---|-----------|---|---|----------|---|---|------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|---------------|-------------------------|------------------|------|
| | 1 | C | T | 1 | C | T | 1 | C | T | 1 | C | G | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P |
| | 1 | C | T | 1 | C | T | 1 | C | T | 1 | C | G | 0.3665 | 1.00 | --- | 0.3702 | 1.00 | --- | 0.3562 | 1.00 | --- |
| | 2 | C | G | 2 | C | A | 2 | C | A | 2 | C | A | 0.3638 | 1.30 (1.01 - 1.68) | 0.042 | 0.3636 | 1.63 (1.20 - 2.25) | 0.0051 | 0.3667 | 0.93 (0.62-1.40) | 0.99 |
| | 3 | G | G | 3 | G | C | 3 | G | C | 3 | G | A | 0.1342 | 1.12 (0.80 - 1.57) | 0.52 | 0.1294 | 1.39 (0.90 - 2.16) | 0.14 | 0.1436 | 0.80 (0.46-1.40) | 0.53 |
| | 4 | C | G | 4 | C | C | 4 | C | C | 4 | C | A | 0.0658 | 1.65 (0.95 - 2.85) | 0.074 | 0.0728 | 2.05 (1.02 - 4.12) | 0.043 | 0.0510 | 0.94 (0.36-2.50) | 0.98 |
| | 5 | C | G | 5 | C | C | 5 | C | G | 5 | C | G | 0.0187 | 1.26 (0.52 - 3.03) | 0.61 | 0.0169 | 0.95 (0.30 - 3.04) | 0.93 | 0.0223 | 1.29 (0.34-4.90) | 0.63 |
| | 6 | C | T | 6 | C | T | 6 | C | T | 6 | C | A | 0.0186 | 1.09 (0.42 - 2.86) | 0.86 | 0.0198 | 1.11 (0.34 - 3.69) | 0.86 | 0.0141 | 0.72 (0.11-4.80) | 0.84 |
| | 7 | C | T | 7 | C | A | 7 | C | A | 7 | C | A | 0.0185 | 0.80 (0.34 - 1.93) | 0.63 | 0.0114 | 0.53 (0.12 - 2.33) | 0.4 | 0.0338 | 1.10 (0.37-3.20) | 0.78 |

816 †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.

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828 **Table 5.** Discriminative value *AUC* for the model including estrogen-related variants.

829

| Reference model | | | | LR test p-value |
|------------------------------------|---------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | |
| Gender (male) | 0.004 | 2.130 (1.387-3.271) | | |
| Age | 0.00066 | 1.030 (1.013-1.048) | 0.629 (0.567-0.692) ^δ | |
| Predictive model including 5 SNPs* | | | | |
| | P-value | OR 95%CI | AUC 95%CI ^a | |
| <i>ESR2</i> _{rs1271572} | 0.002 | 0.414 (0.236-0.726) | | |
| <i>CYP2C9</i> _{rs1799853} | 0.024 | 0.226 (0.062-0.824) | | |
| <i>CYP1B1</i> _{rs10012} | 0.013 | 0.442 (0.233-0.840) | | |
| <i>CYP3A4</i> _{rs2740574} | 0.005 | 5.793 (1.718-19.53) | | |
| <i>SHBG</i> _{rs6259} | 0.011 | 2.316 (1.212-4.425) | | |
| Gender (male) | 0.005 | 0.475 (0.281-0.803) | | |
| Age | 0.00039 | 1.033 (1.015-1.052) | 0.730 (0.672-0.780) ^{δ †} | 2.46•10⁻⁸ |

830 ^aIncluding age and gender as variables never dropped from models and when are compared with a baseline
831 model with AUROC=0.5.

832 *All SNPs showing a significant association with erosive disease ($P < 0.10$) were initially added to the model.

833 After removing all subjects with missing values for any of the variables included in the model, 460 seropositive
834 patients were available for prediction capacity analysis.

835 ^δ A LR test showed that the model including genetic variants fitted better the data than the reference model and
836 that the difference in model fit between both models was statistically significant (-2log likelihood ratio test, $df=6$,
837 **$P=2.46E-08$**).

838 Residual deviance (Reference model): 494.86

839 Residual deviance ("Significant SNPs model): 450.99

840 [†] A sort analysis revealed that this model showed an AUC value systematically higher than those observed in
841 50.000 randomized models:

842 Average AUC of null distribution (50.000 models)=0.644

843 Z score=6.79, **$P_{Z_score-value}(50.000perm)=5.67•10^{-12}$** .

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854 **FIGURE LEGENDS**

855

856 **Figure 1.** *ESR2* mRNA expression levels according to the *ESR2*_{rs1271572} SNP.

857

858 Abreviations: Ref, reference; Alt, alternative.

859 Data extracted from the Gtex portal (<https://www.gtexportal.org/home/>).

860 Reference allele = T

861 Alternative allele = G

862 **P value (Whole Blood) = $3.1 \cdot 10^{-9}$.**

863

864 **Figure 2.** Correlation of hormone-related SNPs with cytokine levels after stimulation of PBMCs or
865 macrophages with LPS, PHA or Pam3Cys (n=408).

866

867 **Figure 3.** Correlation of the *CYP2C9*_{rs1799853} and *ESR1*_{rs2881766} SNPs with vitamin D3 and
868 progesterone levels in women (n=107) and men (n=172).

869

870 Patients using oral contraceptives were excluded from the analysis.

871 After log transformation, linear regression analyses were adjusted for age.

872 NS; non-significant.

873

874 **Figure 4.** Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis.

875 ROC curves summarize the accuracy of prediction for genetic and demographic models in seropositive and seronegative

876 patients. The genetic models (marked in blue) included SNPs that were significantly associated with erosive disease in

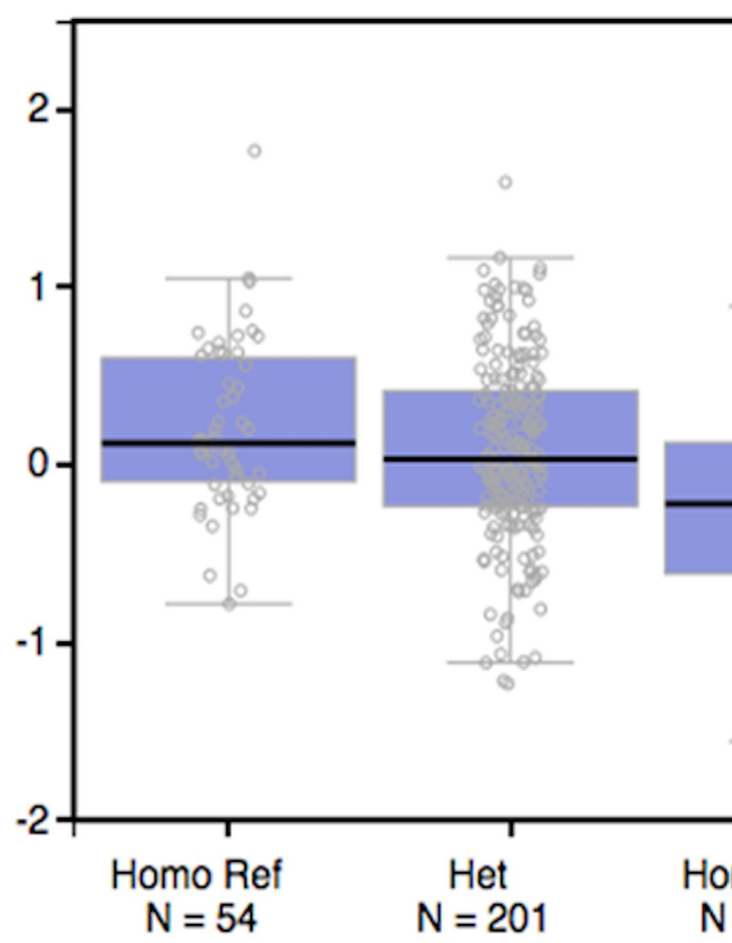
877 seropositive patients (either in the single-SNP or haplotype analyses) whereas the demographic models included

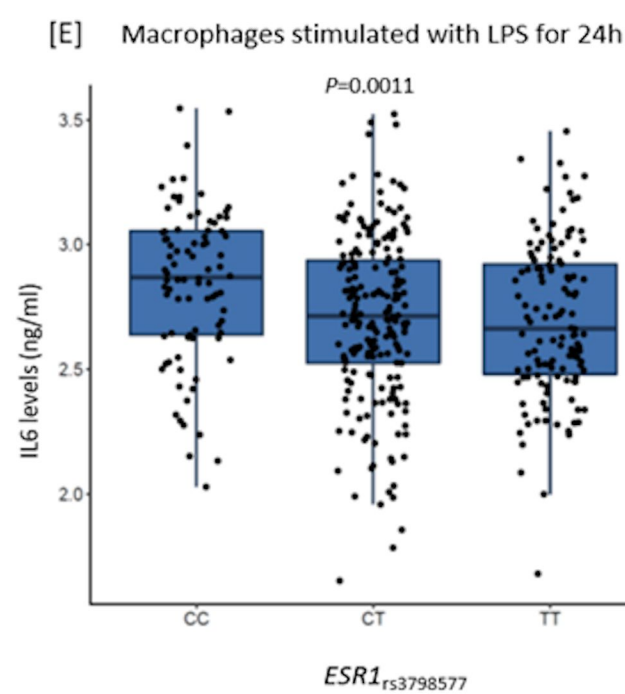
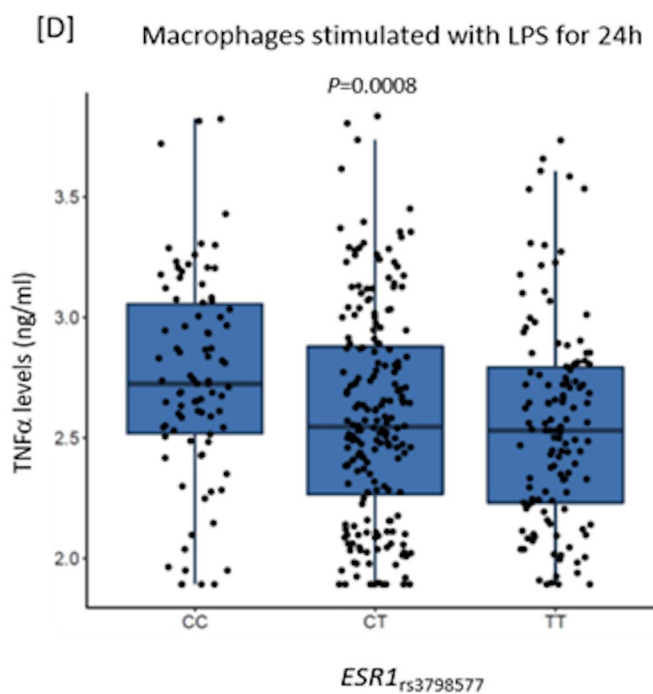
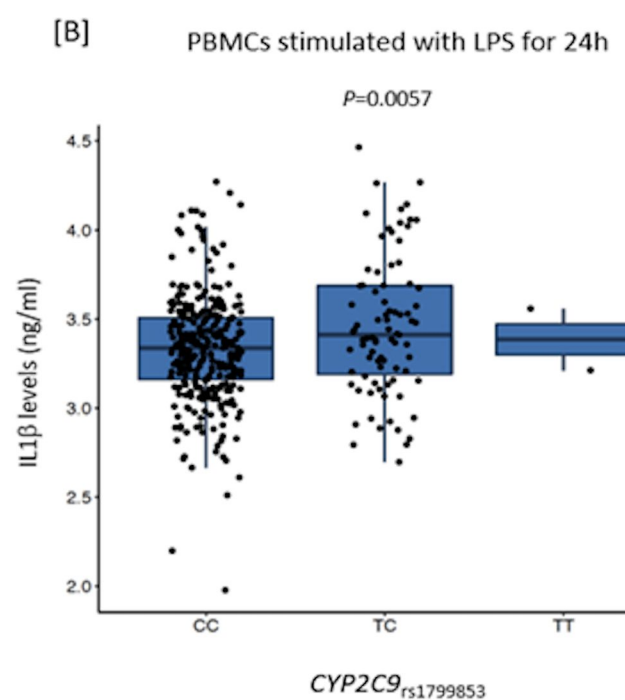
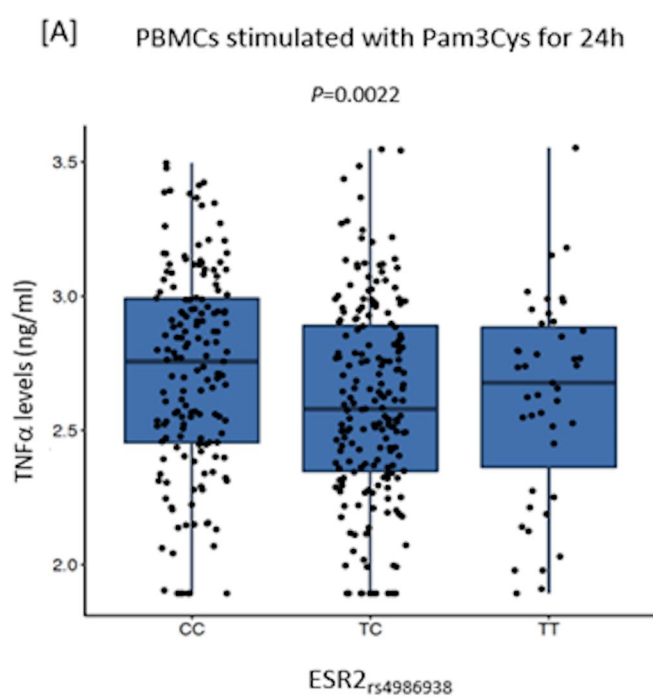
878 demographic variables (age and gender as covariates; marked in red) for seropositive and seronegative patients.

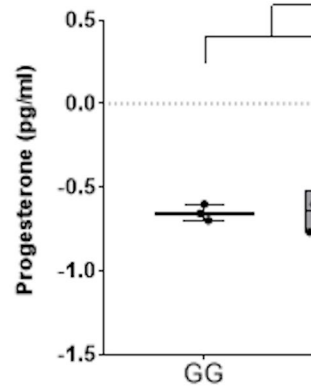
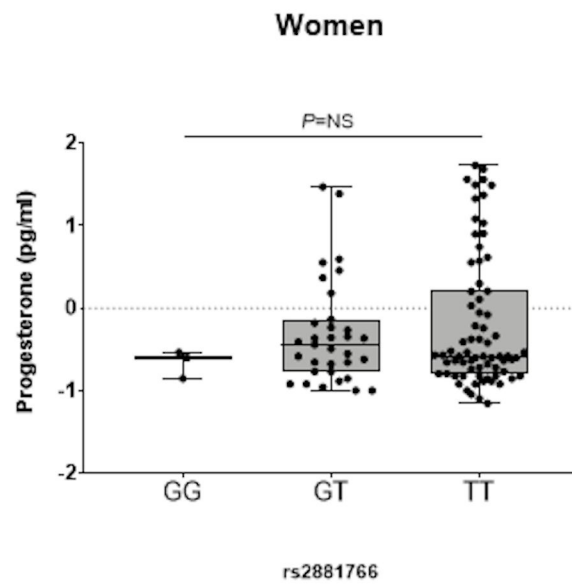
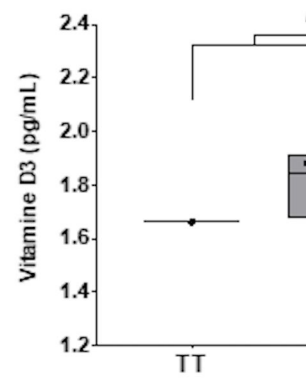
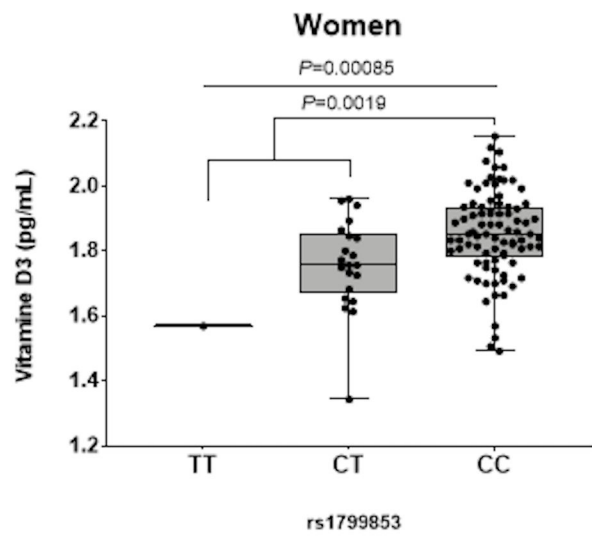
879

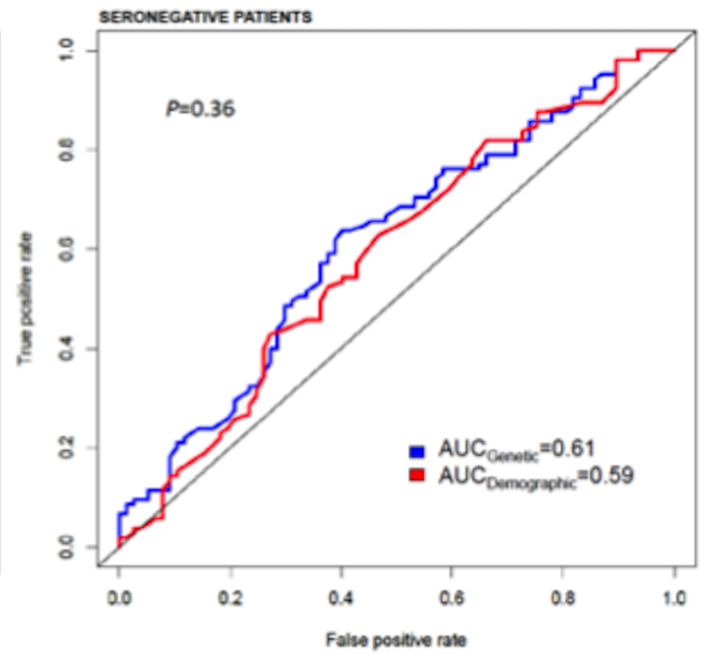
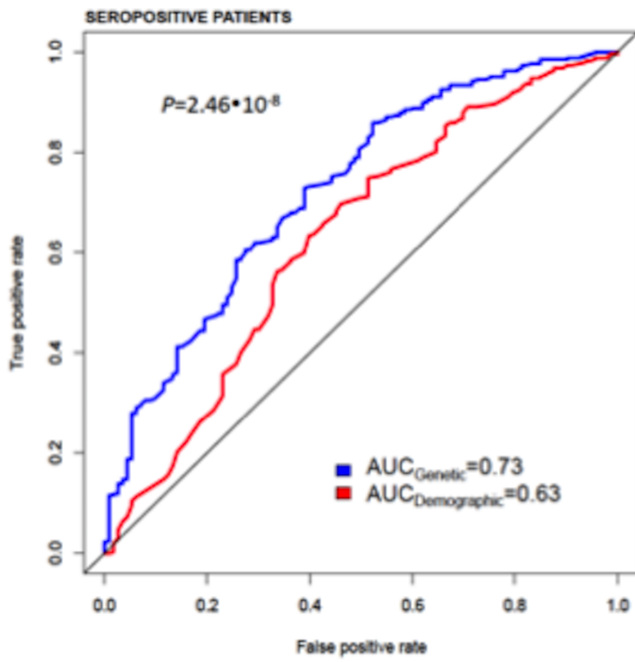
880

Rank Normalized Gene Expression









NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium

Jose Manuel Sánchez-Maldonado^{1,2}, Manuel Martínez-Bueno PhD³, Helena Canhão MD, PhD⁴, Robert Horst⁵, Sonia Muñoz-Peña¹, Ana Moñiz-Díez¹, Ana Rodríguez-Ramos¹, Alejandro Escudero MD, PhD⁸, Signe B Sorensen PhD^{9,10}, Merete L Hetland PhD^{11,12}, Miguel A. Ferrer MD, PhD¹³, Bente Glintborg PhD^{11,12}, Ileana Filipescu MD, PhD¹⁴, Eva Pérez-Pampin MD, PhD¹⁵, Pablo Conesa-Zamora PhD¹⁶, Antonio García MD, PhD¹³, Alfons den Broeder PhD¹⁷, Salvatore De Vita MD, PhD¹⁸, Svend Erik Hove Jacobsen PhD¹⁹, Eduardo Collantes MD, PhD⁸, Luca Quartuccio MD, PhD¹⁸, Mihai G. Netea MD PhD^{5,6}, Yang Li PhD^{5,7}, João E. Fonseca MD, PhD^{20,21}, Manuel Jurado MD, PhD^{1,2}, Miguel Ángel López Nevot MD, PhD^{2,22}, Marieke J. H. Coenen PhD¹⁷, Vibeke Andersen MD PhD^{9,10}, Rafael Cáliz MD, PhD^{1,2,13}, Juan Sainz PhD^{1,2}

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

² Instituto de Investigación Biosanitaria IBs.Granada, Granada, Spain

³ Area of Genomic Medicine, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government, Granada, Spain

⁴ CEDOC, EpiDoC Unit, NOVA Medical School and National School of Public Health, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal.

⁵ Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

⁶ Department for Immunology & Metabolism, Life and Medical Sciences Institute (LIMES), University of Bonn, 53115 Bonn, Germany

⁷ Department of Genetics, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

⁸ Rheumatology department, Reina Sofía Hospital/IMIBIC/University of Córdoba, Córdoba, Spain

⁹ Focused research unit for Molecular Diagnostic and Clinical Research, IRS-Center Sonderjylland, Hospital of Southern Jutland, DK-6200 Aabenraa, Denmark

¹⁰ Institute of Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

¹¹ The DANBIO registry, The Danish Rheumatologic Biobank and Copenhagen Center for Arthritis Research (COPECARE), Center for Rheumatology and Spine Diseases, Centre of Head and Orthopaedics, Rigshospitalet, Glostrup, Denmark

¹² Department of Clinical, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

¹³ Rheumatology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

¹⁴ Rheumatology department, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Romania

¹⁵ Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

¹⁶ Clinical Analysis department, Santa Lucía University Hospital, Cartagena, Spain

¹⁷ Radboud university medical center, Radboud Institute for Health Sciences, Department of Human Genetics, Nijmegen, The Netherlands.

¹⁸ Department of Medical Area, Clinic of Rheumatology, University of Udine, Italy.

¹⁹ Department of Biochemistry and Immunology. University Hospital of Southern Jutland, Denmark.

²⁰ Rheumatology and Metabolic Bone Diseases Department, Hospital de Santa Maria, CHLN, Lisbon, Portugal

²¹ Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal

²² Immunology department. Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

57 **Running title:** NFKB2 variants and rheumatoid arthritis
58 **Key words:** NFKB2 polymorphisms; genetic susceptibility; RA; drug response; TNF inhibitors;
59 personalized medicine.
60

61
62
63 Corresponding author:
64 Juan Sainz, PhD
65 Genomic Oncology Area
66 GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada /
67 Andalusian Regional Government
68 PTS Granada
69 Avda. de la Ilustración, 114
70 18016 Granada, Spain
71
72 Phone: +34-958-715500
73 Fax: +34-958-637071
74 E-mail: juan.sainz@genyo.es
75

76 Word Count: Abstract 278, Text 4444
77 Figures and Tables: 6 Tables, 2 Figures and 5 Supplementary Tables
78
79

80 **ABSTRACT**

81 This study sought to evaluate the association of 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs)
82 within NFKB and inflammasome pathway genes with the risk of rheumatoid arthritis (RA) and
83 response to TNF inhibitors (TNFi). We conducted a case-control study in a European population
84 of 1194 RA patients and 1328 healthy controls. The association of potentially interesting
85 markers was validated with data from the DANBIO (695 RA patients and 978 healthy controls)
86 and DREAM (882 RA patients) registries. The meta-analysis of our data with those from the
87 DANBIO registry confirmed that anti-citrullinated protein antibodies (ACPA)-positive subjects
88 carrying the NFKB2_{rs11574851T} allele had a significantly increased risk of developing RA
89 (PMeta_ACPA+=0.0006) whereas no significant effect was found in ACPA-negative individuals
90 (PMeta_ACPA-=0.35). An ACPA-stratified haplotype analysis including both cohorts (n=4210)
91 confirmed that ACPA-positive subjects carrying the NFKB2_{TT} haplotype had an increased risk of
92 RA (OR=1.39, P=0.0042) whereas no effect was found in ACPA-negative subjects (OR=1.04,
93 P=0.82). The meta-analysis of our data with those from the DANBIO and DREAM registries also
94 revealed a suggestive association of the NFKB2_{rs1056890} SNP with larger changes in DAS28
95 (OR=1.18, P=0.007). Functional experiments showed that peripheral blood mononuclear cells
96 from carriers of the NFKB2_{rs1005044C} allele (in LD with the rs1056890, r2=1.00) showed increased
97 production of IL10 after stimulation with LPS (P=0.0026). These results provide first evidence of
98 a role of the NFKB2 locus in modulating the risk of RA in an ACPA-dependent manner and
99 suggest its implication in determining the response to TNFi. Additional studies are now
100 warranted to further validate these findings.

101

102

103

104

105

106 **Keywords:** NFKB; inflammasome; genetic susceptibility; RA; anti-TNF drug response; erosive
107 disease; personalized medicine.

108 INTRODUCTION

109 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease more frequently diagnosed in
110 females than males, that has a prevalence of about 0.5-1%¹. RA perpetuates and amplifies itself
111 through a wide number of molecular mechanisms involving several immune cell types and
112 multiple inflammatory mediators that are released from the damaged tissue². Although the
113 complexity of inflammatory pathways implicated in RA development and progression remains in
114 part unknown, there are convincing evidences supporting the view that NFKB pathway and its
115 connection with the NLRP3-inflammasome plays a pivotal role in the modulation of the
116 expression of multiple inflammatory genes implicated in RA development³ and drug response or
117 disease progression⁴.

118

119 Activated NFKB has been detected in the synovium of RA patients at both early and late stages
120 of joint inflammation⁵⁻⁸ and once NFKB is activated (for instance, through the interaction of
121 antigen presenting cells and T cells), it triggers two major signaling pathways in the implicated
122 cells: the canonical and the non-canonical NFKB pathway. Whereas the canonical pathway
123 regulates the activation of *NFKB1 p50*, *RELA* and *c-REL* and leads to rapid but transient NFKB
124 activation, the non-canonical NFKB pathway selectively activates p100-sequestered NFKB
125 members (predominantly *NFKB2 p52* and *RELB*) and produces a long-lasting signaling. Even
126 though a cross-talk between the canonical and non-canonical NFKB pathways has been
127 previously reported, the activation of the canonical NFKB pathway is generally associated with
128 inflammation whereas the induction of the non-canonical NFKB pathway was linked to
129 development processes⁹. In RA, it is well known that the acute activation of the canonical
130 pathway on antigen presenting cells and T cells quickly leads to the production of a wide range
131 of essential proinflammatory mediators including cytokines ($TNF\alpha$, $IL1\alpha$, $IL1\beta$, $IL1RA$, $IL2$,
132 $IL12p40$ and $IFN\gamma$), chemokines ($IL8$, $CXCL11$), immunoreceptors ($CD80$, $CD23$, $CD48$, $CD69$,
133 $IL2R$, $TNFRs$, and $CCR5$), cell adhesion molecules ($ELAM-1$, $ICAM-1$, $VCAM-1$ and P -selectin)
134 and growth factors ($GM-CSF$, $IGFBP2$, and $PDGFB$) that often facilitate synovial hyperplasia by
135 promoting cell proliferation and apoptosis inhibition of RA fibroblast-like synovial cells¹⁰. On the

136 contrary, the activation of the non-canonical pathway involves a slow build-up of long-lasting
137 signals that have been implicated in developmental processes including B-cell development¹¹,
138 secondary lymphoid organ development^{12,13} and osteoclast differentiation¹⁴ but also
139 development of myeloid-related CD4⁺CD8 α ⁻ dendritic cells and macrophages¹⁵, key players in
140 modulating immune responses in RA.

141

142 Besides the role of NF κ B in the inflammatory process, recent evidences have shown that the
143 NLRP3-inflammasome is a cytosolic multiprotein complex highly expressed in peripheral blood
144 mononuclear cells of RA patients and in the synovial tissues of osteoarthritis patients. The
145 NLRP3 inflammasome is capable of alerting immune system to the presence of tissue damage
146 and to induce the processing of the IL1 β , IL18 and IL33 pro-cytokines into biologically active
147 proinflammatory mediators that drive cartilage destruction¹⁶. In addition, it has been reported
148 that the presence of mutations in NLRP3-inflammasome-related proteins (CARD8 and NLRP3)
149 predispose to RA^{17,18} and that genetic variation in this pathway might also modulate
150 inflammatory activity in early stages of the disease and thereby affect disease progression^{17,18}.

151

152 Considering the aspects detailed above, but also previous studies suggesting that the NF κ B-
153 and NLRP3-inflammasome pathways are genetically determined¹⁹, we decided to conduct a
154 case-control study to investigate whether 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the
155 *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIB*, *IKBKB*, *GBP6*, *IRF4*, *NLRP3*, *REL*, *RELA*, *KLRC1*, *KLRK1|KLRC4*,
156 *LOC105376246* (ncRNA), *TLR4*, *TLR5*, *TLR9*, *TLR10* and *TRAF1|C5* genes influence the risk
157 of developing RA and the response to TNF inhibitors (TNFi). In addition, we investigated the
158 correlation of selected SNPs with steroid hormone levels and their role in modulating immune
159 responses after stimulation of whole blood, peripheral mononuclear cells (PBMCs) and
160 macrophages with lipopolysaccharide (LPS), phytohemagglutinin (PHA) and Pam3Cys.

161

162 **MATERIAL AND METHODS**

163 *Discovery population*

164 The discovery population consisted of 1194 RA patients and 1328 healthy controls ascertained
165 through the REPAIR consortium (Table 1). RA patients fulfilled the 1987 revised American
166 College of Rheumatology (ACR)²⁰ and the ACR/EULAR 2010 classification criteria²¹. The study
167 followed the Declaration of Helsinki. Study participants were of European origin and gave their
168 written informed consent to participate in the study, which was approved by the ethical review
169 committee of participant institutions. The Ethics committee of each participant institution
170 approved the study protocol: Virgen de las Nieves University Hospital (2012/89); Santa Maria
171 Hospital-CHLN (CE 877/121.2012); University Clinical Hospital of Santiago de Compostela
172 (2013/156). A detailed description of the discovery population has been reported elsewhere²²⁻²⁴.

173

174 *Response to anti-TNF medications*

175 Six hundred and four RA patients treated with TNFi (adalimumab, etanercept, infliximab,
176 golimumab or certolizumab) were included in the drug response analysis of the discovery
177 population. The change in disease activity score (DAS28) at baseline and at 6 months of
178 treatment with TNFi was calculated for each patient. Linear regression analysis adjusted for age
179 and sex was used to determine the association between selected SNPs and changes in DAS28.
180 Subjects with missing values for DAS28 in any of these time points were not included in the
181 analysis.

182

183 *SNP selection and genotyping*

184 NFkB- and inflammasome-related polymorphisms were selected on the basis of their potential
185 functionality and linkage disequilibrium (LD) but also because of existing studies reporting their
186 significant association with the risk of developing autoimmune and immune-related diseases or
187 response to TNFi²⁵⁻²⁹. This strategy resulted in the selection of 28 genetic variants within the
188 *GBP6*, *IKBKB*, *IRF4*, *KLRC1*, *KLRK1*, *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIB*, *NLRP3*, *REL*, *RELA*, *RELB*,
189 *TLR4*, *TLR5*, *TLR9*, *TLR10* and *TRAF1/C5* loci that were genotyped in the discovery population
190 (Table 2). Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the Qiagen Mini Kit (Qiagen,
191 CA, USA) or from saliva using standard procedures. Genotyping was carried out using

192 KASPar® assays (LGC Genomics, London, UK) in a 384-well plate format (Applied Biosystems,
193 CA, USA) according to manufacturer's instructions. Five percent of samples were included as
194 duplicates to ensure high-quality genotyping.

195

196 *Statistical analysis*

197 The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test was performed in the control group by a standard
198 observed-expected chi-square (χ^2). Logistic and linear regression analyses adjusted for age,
199 sex and country of origin were used to assess the main effects of the selected SNPs on RA risk
200 and the response to TNFi respectively. Statistical power was estimated using Quanto software
201 (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). Correction for multiple testing was performed using the Meff method
202 for SNPs genotyped across all populations³⁰. The threshold used for the risk and drug response
203 analyses was 0.0008 ([0.05/22 independent markersx3 inheritance models]).

204

205 *Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis*

206 We performed haplotype frequency estimation and haplotype association analysis adjusted for
207 age, sex and country of origin using SNPstats³¹ and haplo.stats package in STATA. Haplotype
208 frequencies were determined using the Expectation-maximization (EM) algorithm. Haplotypes
209 were reconstructed using SNPtool and Haploview and block structures were determined
210 according to the method of Gabriel *et al.*³².

211

212 *Replication populations and meta-analyses for RA risk and drug response*

213 For replication purposes, we genotyped the most promising SNPs associated with RA risk in a
214 cohort of 695 Danish RA patients and 978 healthy controls³³. Clinical data from RA patients
215 were collected through the DANBIO registry (The National Danish Registry for Biological
216 Treatment of Rheumatic Diseases)³⁴ and DNA samples were obtained from peripheral blood
217 collected at the Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark), which routinely perform
218 screening for tuberculosis before treatment with biological treatments. Healthy blood donors
219 were recruited in Viborg and Sønderborg (Denmark). In order to replicate the most interesting

220 associations with response to TNFi, we also used genetic data from a genome-wide association
221 study (GWAS) on drug response conducted in 882 Dutch RA patients from the DREAM (Dutch
222 RhEumatoid Arthritis Monitoring) registry. Imputed SNPs reporting potentially interesting overall
223 or ACPA-specific associations with RA risk or drug response were genotyped in a subset of 708
224 patients. To further validate our results, we also genotyped the most interesting markers
225 associated with drug response in 555 RA patients from the DANBIO registry that were treated
226 with TNFi. A total of 2107 patients were treated with anti-TNF. Demographic and clinical details
227 of the 3 cohorts are included in Supplementary Table 1. The study was approved by the
228 Institutional review board of the Radboud university medical centre and by the Regional Ethics
229 Committee of Central Denmark Region (M-20100153 and S-20120113). All patients provided
230 written informed consent and clinical information was prospectively gathered from the medical
231 records.

232

233 To test for genetic association, we conducted a meta-analysis of the discovery data with those
234 from the 2 European registries and the I^2 statistic was used to assess statistical heterogeneity
235 between studies. The pooled OR was computed using the random-effect model.

236

237 *Functional analysis of the NFKB and inflammasome-related variants*

238 Cytokine stimulation experiments were conducted in the 500 Functional Genomics (500FG)
239 cohort from the Human Functional Genomics Project (HFGP;
240 <http://www.humanfunctionalgenomics.org/>), which was designed to determine the influence of
241 genomic variation on the variability of immune responses. The HFGP study was approved by
242 the Arnhem-Nijmegen Ethical Committee (no. 42561.091.12) and biological specimens (venous
243 blood) were collected after informed consent was obtained. We assessed whether any of the 28
244 NFKB and inflammasome-related SNPs correlated with cytokine levels (TNF α , IFN γ , IL1 β ,
245 IL1RA, IL6, IL8, IL10, IL17, and IL22) after the stimulation of whole blood, peripheral blood
246 mononuclear cells (PBMCs) or monocyte-derived macrophages from 408 healthy subjects with
247 LPS (1 or 100 ng/ml), PHA (10 μ g/ml), and Pam3Cys (10 μ g/ml). After log transformation, linear

248 regression analyses adjusted for age and sex were used to determine the correlation of
249 selected SNPs with cytokine expression quantitative trait loci (cQTLs). All analyses were
250 performed using R software (<http://www.r-project.org/>). In order to account for multiple
251 comparisons, we used a significant threshold of 0.00025, i.e. 0.05/(22 independent SNPs x 9
252 cytokines).

253

254 Details on PBMCs isolation, macrophage differentiation and stimulation assays have been
255 reported elsewhere³⁵⁻³⁷. Briefly, PBMCs were washed twice in saline and suspended in medium
256 (RPMI 1640) supplemented with gentamicin (10 mg/mL), L-glutamine (10 mM) and pyruvate (10
257 mM). PBMC stimulations were performed with 5×10^5 cells/well in round-bottom 96-wells plates
258 (Greiner) for 24 hours in the presence of 10% human pool serum at 37°C and 5% CO₂.
259 Supernatants were collected and stored in -20°C until used for ELISA. LPS (100ng/ml), PHA
260 (10µg/ml) and Pam3Cys (10µg/ml) were used as stimulators for 24 or 48 hours. Whole blood
261 stimulation experiments were conducted using 100µl of heparin blood that was added to a 48
262 well plate and subsequently stimulated with 400µl of LPS and PHA (final volume 500ul) for 48
263 hours at 37°C and 5% CO₂. Supernatants were collected and stored in -20°C until used for
264 ELISA. Concentrations of human TNF α , IFN γ , IL1 β , IL1RA, IL6, IL8, IL10, IL17, and IL22 were
265 determined using specific commercial ELISA kits (PeliKine Compact, Amsterdam, or R&D
266 Systems), in accordance with the manufacturer's instructions.

267

268 Once we examined the correlation of NF κ B and inflammasome-related polymorphisms with
269 cytokine levels in our functional experiments, we also used the HaploReg SNP annotation tool
270 (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) to further investigate the
271 functional consequences of each specific variant. We also assessed whether any of the
272 potentially interesting markers correlated with mRNA expression levels of their respective genes
273 using data from GTex portal (www.gtexportal.org/home/).

274

275 *Correlation between steroid hormone levels and NFkB- and inflammasome-related SNPs*

276 We also measured serum levels of seven steroid hormones (androstenedione, cortisol, 11-
277 deoxy-cortisol, 17-hydroxy progesterone, progesterone, testosterone and 25 hydroxy vitamin
278 D3) in the 500FG cohort, which includes 531 healthy subjects. Steroid hormones were analyzed
279 by Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry (LCMSMS) after protein precipitation
280 and solid-phase extraction as described in Ter Horst et al. (2016)³⁷ (see also Supplementary
281 Material). Hormone levels and genotyping data were available for a total of 406 subjects.

282

283 After log-transform, correlation between steroid hormone levels and NFkB- and inflammasome-
284 related SNPs was evaluated by linear regression analysis adjusted for age and sex. In order to
285 avoid a possible bias, we excluded those subjects that were using oral contraceptives or those
286 subjects in which this information was not known from the analysis. A total of 379 healthy
287 subjects (107 women and 272 men) were finally available for analysis. A Bonferroni significance
288 threshold was set to 0.00033 considering the number of independent SNPs tested (n=22) and
289 the number of hormones determined (n=7).

290

291 **RESULTS**

292 This study was conducted in a discovery population comprised of 1194 RA patients and 1328
293 healthy controls. RA patients were slightly older than controls (59.22±12.97 vs. 52.67±8.99) and
294 showed an increased female/male ratio compared to healthy controls (4.10 [959/234] vs. 1.39
295 [773/555]). Sixty percent of the RA patients presented positive values of anti-citrullinated protein
296 antibodies (ACPA) and the median disease duration was of 17.60 years and the disease activity
297 score 28 (DAS28) calculated at patient recruitment was of 5.74 (Table 1).

298

299 *Association of selected SNPs with RA risk*

300 All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group (P>0.001). Logistic
301 regression analysis adjusted for age, sex and country of origin showed that carriers of the
302 *NLRP3*_{rs4612666T} allele or the *IRF4*_{rs1050975A/A} and *NFKB2*_{rs12769316T/T} genotypes had an increased

303 risk of developing RA at nominal level of $P \leq 0.05$ ($OR_{Dom} = 1.25$, 95%CI 1.05-1.49, $P = 0.013$;
304 $OR_{Rec} = 1.30$, 95%CI 1.04-1.62, $P = 0.019$; and $OR_{Rec} = 1.70$, 95%CI 1.04-2.78, $P = 0.034$; Table 3).
305 Interestingly, an ACPA-stratified analysis revealed that ACPA-positive subjects carrying the
306 *NFKB1*_{rs4648110A/A} genotype or the *NFKB2*_{rs11574851T} allele had a significantly increased risk of
307 developing RA whereas a non-significant effect was found in ACPA-negative patients (OR_{Rec-}
308 $ACPA+ = 1.65$, 95%CI 1.04-2.63, $P = 0.031$ vs. $OR_{Rec-ACPA-} = 0.86$, 95%CI 0.39-1.90, $P = 0.90$ and per-
309 allele $OR_{ACPA+} = 1.39$, 95%CI 1.06-1.83, $P = 0.017$ and per-allele $OR_{ACPA-} = 1.02$, 95%CI 0.68-1.52,
310 $P = 0.93$; Table 3). On the other hand, we found that seronegative subjects carrying the
311 *KLRC*_{rs7301582T} or *KLRK1*_{rs1049174C} alleles showed a significantly increased risk of developing RA
312 whereas no effect was detected in ACPA-positive individuals ($OR_{Dom-ACPA-} = 1.56$, 95%CI 1.18-
313 2.09, $P = 0.003$ vs. $OR_{Dom-ACPA+} = 1.05$, 95%CI 0.84-1.30, $P = 0.67$ and $OR_{Dom-ACPA-} = 1.38$, 95%CI
314 1.03-1.84, $P = 0.031$ vs. $OR_{Dom-ACPA+} = 1.09$, 95%CI 0.88-1.35, $P = 0.42$).

315

316 Although none of the above-reported associations survived after correction for multiple testing,
317 we attempted to replicate them through meta-analysis of the discovery data with those from the
318 DANBIO registry. The meta-analysis of these two populations, which included 4194 subjects
319 (1888 RA patients and 2306 healthy controls), confirmed that carriers of the *NFKB2*_{rs12769316T/T}
320 genotype had an increased risk of developing RA when compared with those carrying the C
321 allele ($OR_{Meta} = 1.78$, 95%CI 1.21-2.63, $P = 0.0037$, $I^2 = 0.0\%$, $P_{Het} = 0.76$; Supplementary Table 2).
322 In addition, although the association was only significant at nominal level ($P < 0.05$), we also
323 found that carriers of the *NFKB2*_{rs11574851T} allele also had an increased risk of developing RA
324 ($OR_{Meta} = 1.29$, 95%CI 1.02-1.64, $P = 0.035$, $P_{Het} = 0.27$). Given that no population stratification was
325 detected (Supplementary Table 3), these findings suggested that the effect attributed to the
326 *NFKB2* locus on the risk of RA was likely true and might depend on a specific haplotype rather
327 than single SNPs. Following this hypothesis, we performed an overall haplotype analysis that
328 revealed that carriers of the *NFKB2*_{TC} haplotype (including the *NFKB2*_{rs11574851T} allele) had a
329 significantly increased risk of developing RA ($OR = 2.21$, 95%CI 1.37-3.56, $P = 0.0011$). Although

330 this association did not survive multiple testing correction, it pointed to a role of the
331 *NFKB2*_{rs11574851} SNP to confer risk to RA development.

332

333 Most importantly, an ACPA-stratified meta-analysis of our data with those from the DANBIO
334 registry also revealed that each copy of the *NFKB2*_{rs11574851T} allele conferred an additive risk of
335 developing RA in ACPA-positive subjects ($OR_{Meta}=1.48$, 95%CI 1.18-1.86, $P=0.0006$) that was
336 not detected in ACPA-negative individuals (Table 4 and Figure 1). Of note, the association of
337 the *NFKB2*_{rs11574851} SNP with an increased risk of RA remained significant after correction for
338 multiple testing and the direction of the effect was consistent with no significant heterogeneity
339 between cohorts ($P_{Het}=0.40$; Figure 1). The ACPA-stratified meta-analysis of both populations
340 also showed an increased risk of RA in ACPA-positive and ACPA-negative subjects carrying the
341 *NFKB2*_{rs12769316T/T} genotype ($P=0.013$ and $P=0.004$; Table 4 and Supplementary Table 4). Even
342 though none of the associations of the *NFKB2*_{rs12769316T/T} genotype with RA remained significant
343 after correction for multiple testing, these findings supported the notion of a relevant role of the
344 *NFKB2* locus in modulating the RA risk. In order to further confirm this hypothesis, we decided
345 to evaluate whether there was an ACPA-specific haplotype that could influence the risk of
346 developing RA. Interestingly, the ACPA-stratified haplotype analysis including both the
347 discovery and DANBIO cohorts also confirmed that ACPA-positive subjects carrying the
348 *NFKB2*_{IT} haplotype (including the *NFKB2*_{rs11574851T} risk allele) had a significantly increased risk
349 of RA ($OR_{Haplotype-ACPA+}=1.39$, 95%CI 1.11-1.74, $P=0.0042$) whereas no effect was detected in
350 ACPA-negative individuals ($OR_{Haplotype-ACPA-}=1.04$, 95%CI 0.75-1.44, $P=0.82$; Table 5). These
351 results again pointed to an ACPA-specific effect of the *NFKB2* locus to modulate the risk of RA.
352 No additional overall or ACPA-specific associations were confirmed in the meta-analysis of both
353 cohorts.

354

355 On the basis of the effect found for the *NFKB2*_{rs11574851} or *NFKB2*_{rs12769316} SNPs on the risk of
356 developing RA, we decided to analyse whether these SNPs might exert their biological function
357 directly through the modulation of *NFKB2*-mediated immune responses or indirectly through the

358 regulation of steroid hormone levels. To do that we evaluated if there were any correlation
359 between the *NFKB2*_{rs11574851} and *NFKB2*_{rs12769316} SNPs and levels of 9 cytokines (TNF α , IFN γ ,
360 IL1 β , IL1RA, IL6, IL8, IL10, IL17, and IL22) after stimulation of whole blood, PBMCs or
361 macrophages with LPS, PHA or Pam3Cys in a cohort of 408 healthy subjects. Although our
362 functional experiments were well powered, we did not find any significant correlation between
363 the *NFKB2*_{rs11574851} and *NFKB2*_{rs12769316} SNPs and cytokine or steroid hormone levels (data not
364 shown). Although these results might suggest no impact of the *NFKB2* variants in modulating
365 immune responses, it is important to mention that we could not evaluate whether the effect of
366 the *NFKB2*_{rs11574851} and *NFKB2*_{rs12769316} SNPs on the modulation of immune responses could be
367 dependent on ACPA status as the genetic analyses indicate.

368

369 *Association of selected SNPs with the response to anti-TNF drugs*

370 When we evaluated the effect of any of the selected SNPs on the response to TNFi (defined as
371 a change in DAS28 after 6 months of treatment), we found a significant effect of the
372 *NFKB2*_{rs1056890} SNP to modulate the response to TNFi at nominal level ($P < 0.05$). Thus, each
373 copy of the *NFKB2*_{rs1056890T} allele additively increased the drop in DAS28 by 22% after the
374 treatment with TNFi (per-allele OR=1.22, 95%CI 1.03-1.44, $P=0.025$; Table 6). Importantly,
375 when we attempted to replicate this association through a well-powered meta-analysis of our
376 data from the discovery population with those from the DREAM and DANBIO registries
377 ($n=2107$), we could confirm that carriers of the *NFKB2*_{rs1056890T} allele showed a significantly
378 higher improvement in DAS28 after treatment with TNFi (OR_{Meta}=1.18, 95%CI 1.05-1.33,
379 $P=0.0077$, $\hat{I}^2=51.7\%$, $P_{Het}=0.13$; Figure 2A). Although this association did not remain significant
380 after correction for multiple testing and therefore need to be further validated, this finding
381 suggested that the *NFKB2*_{rs1056890} SNP might modulate the response to anti-TNF drugs through
382 the regulation of the *NFKB2*-related immune responses.

383

384 In order to test this hypothesis, we assessed whether the *NFKB2*_{rs1056890} SNP was associated
385 with cytokine and steroid hormone levels in the HFGP cohort. Although this SNP was not

386 included in the genome-wide association data available from the HFGP cohort, we could
387 evaluate the association of this marker with cytokine and steroid hormone levels through the
388 analysis of neighbouring SNPs in strong LD with it. Our stimulation experiments showed that
389 PBMCs from carriers of the *NFKB2*_{rs1005044C} allele (in complete LD with the rs1056890T allele,
390 $r^2=1.00$) showed an increased production of IL10 after stimulation of PBMCs with LPS for 24h
391 ($P=0.0025$; Figure 2B). The analysis of additional neighbouring SNPs belonging to the same LD
392 block allowed us to confirm the association of the rs1056890T allele with increased levels of
393 IL10 (Supplementary Table 5). Although the association of the *NFKB2*_{rs1056890} SNP with a better
394 response to TNFi and its correlation with higher levels of IL10 did not remain statistically
395 significant after correction for multiple testing, altogether these findings point to a role of this
396 marker in determining the response to TNFi likely through the modulation of IL10-mediated
397 immune responses. No significant association of the *NFKB2*_{rs1056890} SNP with response to TNFi
398 was observed when association analysis was stratified by ACPA, which dismissed the
399 implication of ACPA in the functional effect attributed to this polymorphism. We did not find
400 correlation of any of the *NFKB2* SNPs with steroid hormone levels (data not shown), which also
401 ruled out the implication of steroid hormones in the modulation of the IL10-mediated immune
402 responses.

403

404 **DISCUSSION**

405 Our data provided, for the first time, evidence that *NFKB2* locus might modulate the risk of RA.
406 The meta-analysis of the data obtained in the discovery population with those from the DANBIO
407 cohort showed a potentially interesting overall association of the *NFKB2*_{rs11574851} SNP with the
408 risk of RA that was further confirmed in an overall haplotype analysis. Most importantly, we
409 found that the effect attributed to the *NFKB2* locus on RA risk depended on the ACPA status.
410 An ACPA-stratified meta-analysis of the discovery and DANBIO populations including 3712
411 subjects revealed that ACPA-positive subjects carrying the *NFKB2*_{rs11574851T} allele had a
412 significantly increased risk of developing RA whereas no effect was detected in ACPA-negative
413 individuals. Of note, the association of the *NFKB2*_{rs11574851T} allele with an increased risk of RA in

414 ACPA-positive subjects remained significant even after correction for multiple testing and was
415 further confirmed in an ACPA-stratified haplotype analysis that showed that the presence of the
416 *NFKB2*_{rs11574851T} allele was driving the effect of the *NFKB2*_{TA} haplotype on the risk of RA in
417 ACPA positive subjects but not in ACPA-negative individuals.

418

419 The *NFKB2* gene is located on chromosome 10q24 and it encodes for a subunit of the *NFKB*
420 complex (p100/p52) that is expressed in multiple immune cells and modulates the inflammation.
421 Other important processes involved in the RA pathology such as Th1 immune responses,
422 activation, abnormal apoptosis and osteoclast differentiation and proliferation¹⁰ are also
423 impacted. It is broadly known that RA arises as a consequence of the interaction between
424 genetic and environmental factors and that the *NFKB* pathway plays a central role in
425 determining the onset of the disease and its progression. In addition, it has been reported that
426 the genetic and environmental factors that predispose to RA development are substantially
427 different between ACPA-positive and ACPA-negative subjects. Recent studies have
428 demonstrated, for instance, that the effect attributed to the two major genetic risk factors for RA
429 (shared epitope of the HLADRB1 and a SNP on the PTPN22 gene) is clearly dependent on the
430 ACPA status having a more evident effect in ACPA-positive subjects than in those lacking of
431 these antibodies³⁸. Furthermore, recent GWAS studies^{39,40} have reported the existence of a
432 completely different genetic component or even a gene-smoking interaction pattern between
433 ACPA-positive and ACPA-negative patients, again suggesting a relevant role of ACPA in
434 determining the onset of the disease^{39,40}. However, up to now, little is known about the effect of
435 ACPA on the control of the *NFKB* pathway. Interestingly, recent investigations have
436 demonstrated that the treatment of PBMCs-derived macrophages with ACPA induced the
437 activation of the *NFKB* pathway and subsequently the induction of the NLRP3-inflammasome
438 and the production of pro-inflammatory cytokines⁴¹. Mechanistically, it was demonstrated that
439 ACPA induces the activation of the *NFKB* pathway through the induction of the interaction
440 between CD147 and integrin β 1 or ATGB1, which in turn activates the downstream Akt/*NFKB*
441 signalling pathway, resulting in the upregulation of NLRP3 and pro-IL-1 β expression and further

442 NLRP3 inflammasome activation⁴¹. Considering these interesting findings, we decided to assess
443 in the HFGP cohort if there was any correlation between the *NFKB2* SNPs and pro- and anti-
444 inflammatory cytokine production after stimulation of whole blood, PBMCs or monocyte-derived
445 macrophages with LPS, PHA or Pam3Cys. We also analysed whether *NFKB2* variants could
446 indirectly affect immune responses through the modulation of steroid hormone levels. Despite
447 the use of a large cohort of healthy subjects from the HFGP cohort, we could not find any
448 significant correlation between the *NFKB2*_{rs11574851} and *NFKB2*_{rs12769316} SNPs and cytokine or
449 steroid hormone levels. Although these results suggested that these variants might not exert
450 their effect on RA risk through the modulation of *NFKB2*- or steroid hormone-mediated immune
451 responses, we could not rule out the possibility of a true effect of these variants on the immune
452 response as their effect might depend on the presence of ACPA (as suggested by our genetic
453 data) or even specific haplotypes. In line with this hypothesis, *in silico* analysis using Haploreg
454 data showed that the *NFKB2*_{rs11574851} and *NFKB2*_{rs12769316} SNPs mapped among histone marks
455 in multiple primary T helper naïve and memory cells and primary B cells from peripheral blood
456 and they were predicted to act as enhancers in T helper memory cells and to change motifs for
457 Po6fu1, AP-4, CEBPB, Mef2 and RP58. Even though these data supported the idea of a role of
458 *NFKB2* variants in modulating immune responses, we think that additional experiments are still
459 needed to determine whether ACPA or specific haplotypes are factors involved in modulating
460 the effect of the *NFKB2* locus on the risk of RA.

461

462 Besides the role of the *NFKB2* locus in determining the risk of RA, this study also showed a
463 noticeable impact of the *NFKB2* gene in the modulation of the response to TNFi. In particular,
464 the meta-analysis of the discovery population with data from the DREAM and DANBIO
465 registries, including 2107 RA patients, showed that carriers of the *NFKB2*_{rs1056890T} allele had an
466 improvement in DAS28 after treatment with TNFi. We found that the direction of the effect of the
467 *NFKB2*_{rs1056890} SNP on drug response was consistent across populations and that the effect was
468 statistically significant in 2 of the 3 populations analysed. Although at this point it tempting to
469 speculate that this SNP constitutes a biomarker for good response to TNFi in RA patients that

470 might help to design more individualized treatment strategies, the association did not remain
471 significant after correction for multiple testing and, therefore, need to be confirmed in
472 independent populations. Mechanistically, we found that the presence of neighbouring genetic
473 markers in strong LD with the *NFKB2*_{rs1056890} SNP were associated with increased levels of IL10,
474 suggesting that the *NFKB2* locus might be implicated in modulating IL10-mediated immune
475 responses. Although the association of the *NFKB2*_{rs1056890} SNP with IL10 levels neither survive
476 correction for multiple testing, our results were in agreement with previous studies
477 demonstrating that *NFKB2* unlikely *NFKB1* is implicated in the control of antigen presenting cell
478 function and not in the activation of T and B cells. Likewise, recent studies have also identified
479 genetic polymorphisms within the *NFKB* pathway as genetic biomarkers for response to TNFi in
480 RA⁴² but also other autoimmune diseases⁴², which further supported our hypothesis suggesting
481 a key role of the *NFKB2* gene in modulating the response to TNFi. In addition, *in silico* tools
482 such as Regulome showed that the rs1056890 SNP has a score of 4, which means that this
483 polymorphism could affect transcription factor affinity and DNase peak⁴³. Using haploreg it was
484 also suggested that the *NFKB2*_{rs1056890} SNP might play a role in modulating immune responses
485 as it mapped among histone marks in primary T helper naïve and T helper memory cells, T
486 regulatory and primary NK cells and it was predicted to alter binding motifs for NRSF, Sin3Ak-20
487 and PLAG1. These transcription factors have been implicated in bone-related diseases⁴⁴ and
488 their activation results in up-regulation of multiple target genes including immune-related genes
489 such as macrophage colony stimulator factor (MCSF) and insulin growth factor (IGF)-2.

490

491 **CONCLUSIONS**

492 In conclusion, this study reports, for the first time, a consistent association of the *NFKB2*_{rs11574851}
493 polymorphism and *NFKB2*_{TT} haplotype with an increased risk of developing RA in ACPA-
494 positive subjects. In addition, this study suggests a possible role of the *NFKB2* locus in the
495 modulation of the response to TNFi. Mechanistically, the functional experiments in the 500FG
496 cohort suggested that the effect attributed to the *NFKB2* gene in the modulation of the response
497 to TNFi might be mediated by IL10-mediated immune responses. However, additional studies

498 are still warranted to shed light into the biological processes that link *NFKB2* SNPs and RA risk
499 and drug response.

500

501 **COMPETING INTERESTS**

502 VA has received compensation for consultancy and for being a member of an advisory board
503 from MSD (Merck) and Janssen. BG received funding for research from AbbVie, Biogen, and
504 Pfizer. MLH received funding for research from Abbvie, Biogen, BMS, CellTrion, MSD, Novartis,
505 Orion, Pfizer, Samsung and UCB. The rest of authors declare that they have no competing
506 interests.

507

508 **FUNDING**

509 This work was partially supported by intramural funds of GENYO and FIBAO foundation
510 (Granada, Spain); Novo Nordisk Fonden (NNF15OC0016932, VA); and Knud og Edith Eriksens
511 Mindefond (VA) and Gigtforeningen (A2037, A3570, VA). MGN was supported by a Spinoza
512 grant from the Netherlands Organization for Scientific Research.

513

514 **DATA AVAILABILITY**

515

516 All data used in this project have been meticulously cataloged and archived in the BBMRI-NL
517 data infrastructure (<https://hfgp.bbmri.nl/>) using the MOLGENIS open source platform for
518 scientific data⁴⁵. This allows flexible data querying and download, including sufficiently rich
519 metadata and interfaces for machine processing (R statistics, REST API) and using FAIR
520 principles to optimize Findability, Accessibility, Interoperability and Reusability⁴⁶. Genetic data
521 from the discovery and DANBIO populations can be accessed at <ftp.genyo.es> and data from the
522 DREAM registry are available at <https://www.synapse.org/#!Synapse:syn3280809/wiki/194735>
523 and <https://www.synapse.org/#!Synapse:syn3280809/wiki/194736>

524

525

526 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

527 R. Caliz and J. Sainz designed the study and drafted the manuscript. J. Sanchez-Maldonado, A.
528 Moñiz-Díez, S. Muñoz-Peña, and A. Rodríguez-Ramos were responsible for genotyping. H.
529 Canhão, A. Escudero, SB. Sorensen, ML. Hetland, MA. Ferrer, B. Glintborg, I. Filipescu, E.
530 Pérez-Pampin, P. Conesa-Zamora, A. García, A. den Broeder, S. de Vita, SEH. Jacobsen, E.
531 Collantes, L. Quartuccio, JE. Fonseca, M. Jurado, MA. López-Nevot, MJH. Coenen, V.
532 Andersen, R. Cáliz and J. Sainz coordinated the sample collection and H. Canhão, I. Filipescu,
533 A García, and MA Ferrer were involved in the records review and data acquisition. M. Martínez-
534 Bueno and J. Sainz performed data quality control and statistical analysis. M. Netea, R Ter
535 Horst, Y Li provided the functional raw data and J. Sainz performed the analysis of functional
536 data. All authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

537

538 **ACKNOWLEDGMENTS**

539 We thank all participants who have agreed to participate in this study. Authors also thank María
540 Dolores Casares, Ángeles Molina, Carmen Oloriz for the collection of Spanish samples and
541 Hans Jurgen Hoffmann, Marianne Thomsen, Vibeke Østergaard Thomsen, Malene Rohr
542 Andersen, Lise Lotte B. Laursen, Helle Jørgensen, Ram Benny Christian Dessau, Niels Steen
543 Krogh, Ulla Vogel, Paal Skytt Andersen, Ivan Brandslund, Steffen Bank, Frederik Trier Møller,
544 Nikolai Toft and Niels Møller Andersen for the participation in collection and purification of
545 Danish samples. We also thank the Danish Departments of Rheumatology for their implication
546 in the collection of clinical data from RA patients included in the DANBIO cohort and the Danish
547 Rheumatologic Biobank. Likewise, we would like to thank Teun van Herwaarden for steroid
548 hormone measurements in serum samples from subjects ascertained through the HFGP
549 initiative.

550

551 **REFERENCES**

552 1 Silman, A. J. & Pearson, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis*
553 *research 4 Suppl 3*, S265-272, (2002).

- 554 2 McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England*
555 *journal of medicine* **365**, 2205-2219, (2011).
- 556 3 Barnes, P. J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic
557 inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* **336**, 1066-1071, (1997).
- 558 4 Han, Z., Boyle, D. L., Manning, A. M. & Firestein, G. S. AP-1 and NF-kappaB regulation
559 in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* **28**, 197-208,
560 (1998).
- 561 5 Asahara, H., Asanuma, M., Ogawa, N., Nishibayashi, S. & Inoue, H. High DNA-binding
562 activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with
563 rheumatoid arthritis. *Biochemistry and molecular biology international* **37**, 827-832,
564 (1995).
- 565 6 Marok, R. *et al.* Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human
566 inflamed synovial tissue. *Arthritis and rheumatism* **39**, 583-591, (1996).
- 567 7 Gilston, V. *et al.* NF-kappa B activation in human knee-joint synovial tissue during the
568 early stage of joint inflammation. *Biochemical Society transactions* **25**, 518S, (1997).
- 569 8 Miyazawa, K., Mori, A., Yamamoto, K. & Okudaira, H. Constitutive transcription of the
570 human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-
571 kappaB and CBF1. *The American journal of pathology* **152**, 793-803, (1998).
- 572 9 Pomerantz, J. L. & Baltimore, D. Two pathways to NF-kappaB. *Molecular cell* **10**, 693-
573 695, (2002).
- 574 10 Makarov, S. S. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation,
575 hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis research* **3**, 200-206, (2001).
- 576 11 Weih, D. S., Yilmaz, Z. B. & Weih, F. Essential role of RelB in germinal center and
577 marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *Journal of*
578 *immunology* **167**, 1909-1919, (2001).
- 579 12 Dejardin, E. *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene
580 expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535, (2002).

- 581 13 Basak, S., Shih, V. F. & Hoffmann, A. Generation and activation of multiple dimeric
582 transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Molecular and cellular*
583 *biology* **28**, 3139-3150, (2008).
- 584 14 Vaira, S. *et al.* RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for
585 osteoclast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
586 *United States of America* **105**, 3897-3902, (2008).
- 587 15 Wu, L. *et al.* RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha-
588 dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* **9**, 839-
589 847, (1998).
- 590 16 Guo, C. *et al.* NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of
591 rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **194**, 231-243, (2018).
- 592 17 Kastbom, A., Johansson, M., Verma, D., Soderkvist, P. & Rantapaa-Dahlqvist, S.
593 CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early
594 rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **69**, 723-726, (2010).
- 595 18 Kastbom, A. *et al.* Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences
596 susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project).
597 *Rheumatology* **47**, 415-417, (2008).
- 598 19 Verma, D. *et al.* The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration
599 leading to excessive interleukin-1beta and IL-18 production. *PloS one* **7**, e34977, (2012).
- 600 20 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the
601 classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**, 315-324, (1988).
- 602 21 van Gestel, A. M. *et al.* Development and validation of the European League Against
603 Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary
604 American College of Rheumatology and the World Health Organization/International
605 League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* **39**, 34-40, (1996).
- 606 22 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to
607 rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study.
608 *Pharmacogenet Genomics* **25**, 432-443, (2015).

609 23 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within immune-modulating genes influence the risk of
610 developing rheumatoid arthritis and anti-TNF drug response: a two-stage case-control
611 study. *Pharmacogenet Genomics* **25**, 432-443, (2015).

612 24 Canet, L. M. *et al.* Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to
613 rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study.
614 *Pharmacogenet Genomics* **25**, 323-333, (2015).

615 25 Sode, J. *et al.* Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker predicting
616 response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* **18**, 81-86,
617 (2018).

618 26 Liu, C. *et al.* Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms
619 associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis.
620 *Molecular medicine* **14**, 575-581, (2008).

621 27 Sode, J. *et al.* Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated
622 with Anti-TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PloS one* **10**, e0139781,
623 (2015).

624 28 Bek, S. *et al.* Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF
625 treatment response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* **17**, 403-411, (2017).

626 29 Gregersen, P. K. *et al.* REL, encoding a member of the NF-kappaB family of
627 transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nature*
628 *genetics* **41**, 820-823, (2009).

629 30 Nyholt, D. R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms
630 in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* **74**, 765-769, (2004).

631 31 Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R. & Moreno, V. SNPStats: a web tool for the
632 analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**, 1928-1929, (2006).

633 32 Gabriel, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*
634 **296**, 2225-2229, (2002).

- 635 33 Canet, L. M. *et al.* Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone
636 receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients.
637 *Pharmacogenomics J*, (2018).
- 638 34 Ibfelt, E. H., Jensen, D. V. & Hetland, M. L. The Danish nationwide clinical register for
639 patients with rheumatoid arthritis: DANBIO. *Clinical epidemiology* **8**, 737-742, (2016).
- 640 35 Li, Y. *et al.* A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine
641 Production in Humans. *Cell* **167**, 1099-1110 e1014, (2016).
- 642 36 Schirmer, M. *et al.* Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine
643 Production Capacity. *Cell* **167**, 1897, (2016).
- 644 37 Ter Horst, R. *et al.* Host and Environmental Factors Influencing Individual Human
645 Cytokine Responses. *Cell* **167**, 1111-1124 e1113, (2016).
- 646 38 Viatte, S. *et al.* Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated
647 peptide antibody negative patients. *Annals of the rheumatic diseases* **71**, 1984-1990,
648 (2012).
- 649 39 Padyukov, L. *et al.* A genome-wide association study suggests contrasting associations
650 in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic*
651 *diseases* **70**, 259-265, (2011).
- 652 40 Jiang, X. *et al.* An Immunochip-based interaction study of contrasting interaction effects
653 with smoking in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis.
654 *Rheumatology* **55**, 149-155, (2016).
- 655 41 Dong, X. *et al.* ACPAs promote IL-1beta production in rheumatoid arthritis by activating
656 the NLRP3 inflammasome. *Cellular & molecular immunology*, (2019).
- 657 42 Bank, S. *et al.* Polymorphisms in the NFkB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways
658 are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory
659 bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **49**, 890-903, (2019).
- 660 43 Boyle, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using
661 RegulomeDB. *Genome research* **22**, 1790-1797, (2012).

662 44 Zhang, Y. *et al.* Endochondral ossification pathway genes and postmenopausal
663 osteoporosis: Association and specific allele related serum bone sialoprotein levels in
664 Han Chinese. *Sci Rep* **5**, 16783, (2015).

665 45 Swertz, M. A. *et al.* The MOLGENIS toolkit: rapid prototyping of biosoftware at the push
666 of a button. *BMC Bioinformatics* **11 Suppl 12**, S12, (2010).

667 46 Wilkinson, M. D. *et al.* The FAIR Guiding Principles for scientific data management and
668 stewardship. *Sci Data* **3**, 160018, (2016).

669 47 Ovejero-Benito, M. C. *et al.* Polymorphisms associated with etanercept response in
670 moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics* **18**, 631-638, (2017).

671 48 Kichaev, G. *et al.* Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS
672 Power. *American journal of human genetics* **104**, 65-75, (2019).

673 49 Iwaszko, M. *et al.* Influence of CD94 and NKG2A variants on susceptibility to rheumatoid
674 arthritis and efficacy of anti-TNF treatment. *Joint Bone Spine* **83**, 75-79, (2016).

675 50 Iwaszko, M. *et al.* Influence of NKG2D Genetic Variants on Response to Anti-TNF
676 Agents in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Genes (Basel)* **9**, (2018).

677 51 Suhre, K. *et al.* Connecting genetic risk to disease end points through the human blood
678 plasma proteome. *Nat Commun* **8**, 14357, (2017).

679 52 Piotrowski, P., Lianeri, M., Olesinska, M. & Jagodzinski, P. P. Prevalence of the NKG2D
680 Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* **39**,
681 1343-1347, (2012).

682 53 Kabalak, G. *et al.* Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus
683 erythematosus in two populations. *Hum Immunol* **71**, 74-78, (2010).

684 54 Stahl, E. A. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new
685 rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics* **42**, 508-514, (2010).

686 55 Eyre, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for
687 rheumatoid arthritis. *Nature genetics* **44**, 1336-1340, (2012).

688 56 Ali, F. R. *et al.* An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset
689 psoriasis validates association of the REL gene. *Br J Dermatol* **168**, 864-866, (2013).

690 57 Varade, J. *et al.* Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune
691 diseases. *Annals of the rheumatic diseases* **70**, 711-712, (2011).

692 58 Chen, F. *et al.* Genetic Variation in the REL Gene Increases Risk of Behcet's Disease in
693 a Chinese Han Population but That of PRKCQ Does Not. *PloS one* **11**, e0147350,
694 (2016).

695 59 Ellinghaus, E. *et al.* Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies
696 susceptibility locus at REL. *J Invest Dermatol* **132**, 1133-1140, (2012).

697 60 Bowes, J. *et al.* Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a
698 large psoriatic arthritis cohort. *Annals of the rheumatic diseases* **71**, 1350-1354, (2012).

699 61 Tang, H. *et al.* TLR10 and NFKBIA contributed to the risk of hip osteoarthritis: systematic
700 evaluation based on Han Chinese population. *Sci Rep* **8**, 10243, (2018).

701 62 Vrgoc, G. *et al.* Interleukin-17 and Toll-like Receptor 10 genetic polymorphisms and
702 susceptibility to large joint osteoarthritis. *J Orthop Res* **36**, 1684-1693, (2018).

703 63 Nishikawa, R. *et al.* Genetic prediction of the effectiveness of biologics for psoriasis
704 treatment. *J Dermatol* **43**, 1273-1277, (2016).

705 64 Gebura, K. *et al.* Polymorphisms within Genes Involved in Regulation of the NF-kappaB
706 Pathway in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).

707 65 Wang, H., Zhou, S., Zhang, J., Lei, S. & Zhou, J. Correlations between TLR
708 polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control
709 studies. *Immunol Res* **67**, 142-150, (2019).

710 66 Bank, S. *et al.* Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways
711 Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort.
712 *PloS one* **10**, e0145302, (2015).

713 67 Bank, S. *et al.* Genetically determined high activity of IL-12 and IL-18 in ulcerative colitis
714 and TLR5 in Crohns disease were associated with non-response to anti-TNF therapy.
715 *Pharmacogenomics J* **18**, 87-97, (2018).

716 68 Loft, N. D. *et al.* Associations between functional polymorphisms and response to
717 biological treatment in Danish patients with psoriasis. *Pharmacogenomics J* **18**, 494-500,
718 (2018).

719 69 Oliveira-Tore, C. F. *et al.* Genetic Polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 9 as
720 Susceptibility Factors for the Development of Ankylosing Spondylitis and Psoriatic
721 Arthritis. *J Immunol Res* **2019**, 1492092, (2019).

722 70 Yi, X., Xu, E., Xiao, Y. & Cai, X. Evaluation of the Relationship Between Common
723 Variants in the TLR-9 Gene and Hip Osteoarthritis Susceptibility. *Genet Test Mol*
724 *Biomarkers* **23**, 373-379, (2019).

725 71 Zheng, M. *et al.* Association between TLR-9 gene rs187084 polymorphism and knee
726 osteoarthritis in a Chinese population. *Bioscience reports* **37**, (2017).

727 72 Huang, C. M. *et al.* Association of toll-like receptor 9 gene polymorphism in Chinese
728 patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Rheumatol Int* **32**, 2105-2109,
729 (2012).

730 73 Bank, S. *et al.* Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9,
731 LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG
732 are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS*
733 *one* **9**, e98815, (2014).

734 74 Cho, W. K. *et al.* Association of Polymorphisms in Toll-Like Receptors 4 and 9 with
735 Autoimmune Thyroid Disease in Korean Pediatric Patients. *Int J Endocrinol* **2017**,
736 2304218, (2017).

737 75 Bank, S. *et al.* Associations between functional polymorphisms in the NFkappaB
738 signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with
739 inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J* **14**, 526-534, (2014).

740 76 Plenge, R. M. *et al.* TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genome-wide
741 study. *The New England journal of medicine* **357**, 1199-1209, (2007).

742

743

744

745

Table 1. Demographic and clinical characteristics of RA patients.

| Demographic characteristics | RA patient populations | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| | Discovery Population (n=1194) | DREAM [†] Registry (n=882) | DANBIO Registry (n=695) |
| <i>Age (years)</i> | 59.22 ± 12.97 | 54.63 ± 12.80 | 54.27 ± 13.30 |
| <i>Gender ratio (female/male)</i> | 4.01 (959/234) | 2.07 (477/230) | 2.80 (512/183) |
| Clinical assessment | | | |
| <i>RF positive patients*</i> | 764 (68.64) | 534 (77.62) | 221 (64.06) |
| <i>ACPA positive patients*</i> | 643 (70.74) | 151 (62.14) | 390 (72.90) |
| <i>DAS28 at baseline</i> | 5.74 ± 2.15 | 5.33 ± 1.26 | 4.77 ± 1.23 |
| <i>Disease duration (years)</i> | 17.60 ± 9.99 | 9.70 ± 9.57 | 7.89 ± 8.86 |
| Treatments | | | |
| <i>csDMARDs at baseline</i> | | | |
| <i>Methotrexate (%)</i> | 798 (66.83) | 463 (65.40) | 514 (73.95) |
| <i>Leflunomide (%)</i> | 324 (27.14) | ND | ND |
| <i>Sulphasalazine (%)</i> | 149 (12.48) | ND | ND |
| <i>First biologic agent</i> | | | |
| <i>Infliximab (%)</i> | 386 (32.33) | 244 (34.46) | 159 (22.88) |
| <i>Etanercept (%)</i> | 227 (19.01) | 130 (18.36) | 200 (28.78) |
| <i>Adalimumab (%)</i> | 191 (16.00) | 334 (47.18) | 173 (24.89) |
| <i>Golimumab (%)</i> | 17 (01.42) | - | 47 (06.76) |
| <i>Certolizumab (%)</i> | - | - | 72 (10.36) |
| <i>Rituximab (%)</i> | 13 (01.09) | - | 16 (02.30) |
| <i>Tocilizumab (%)</i> | 6 (00.50) | - | 19 (02.73) |
| <i>Anakinra (%)</i> | - | - | 2 (00.29) |
| <i>Others (%)</i> | 14 (01.17) | - | 7 (01.01) |

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

Data are means ± standard deviation or n (%). Abbreviations: RF, rheumatoid factor; ACPA: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; DAS28, disease activity score; csDMARDs, conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs. ND, not determined (unknown).

[†] Clinical data for 708 RA patients that were available for genotyping.

* RF was available for 1113, 688 and 345 patients in the discovery, DREAM and DANBIO populations, respectively.

* ACPA was available for 908, 127 and 535 patients in the discovery, DREAM and DANBIO populations, respectively.

Table 2. Selected SNPs within NFKB-related genes.

| Gene | Chr. | dbSNP rs# | Nucleotide substitution | Effect -allele | Location | Reported associations with autoimmune diseases, drug response and/or potential functional role |
|--------------|------|------------|-------------------------|----------------|--------------------|---|
| GBP6 | 1 | rs928655 | A/G | A | Intronic | Associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis ⁴⁷ |
| IKKB | 8 | rs11986055 | A/C | A | Intronic | |
| IRF4 | 6 | rs1050975 | A/G | A | 3'-UTR/lncRNA | |
| IRF4 | 6 | rs12203592 | C/T | T | Intronic | Correlated with white blood cell count ⁴⁸ |
| IRF4 | 6 | rs1877175 | C/T | T | 3'-UTR/lncRNA | |
| IRF4 | 6 | rs7768807 | T/C | T | 3'-UTR/lncRNA | |
| KLRC1 | 12 | rs7301582 | C/T | T | Intronic | Associated with response to anti-TNF therapy in RA patients ⁴⁹ |
| KLRC1 KLRC4 | 12 | rs1049174 | C/G | C | 3'UTR/Intronic | Associated with response to anti-TNF therapy in RA patients ⁵⁰ |
| KLRC1 KLRC4 | 12 | rs1154831 | A/C | A | Intronic/Near gene | Lack of association with response to anti-TNF therapy ⁵⁰ |
| KLRC1 KLRC4 | 12 | rs2255336 | A/G | A | Thr72Ala | Correlation with blood NKG2D type II integral membrane protein levels ⁵¹ and associated with response to anti-TNF therapy in RA patients ⁵⁰ ; Associated with a decreased risk of Lupus erythematosus ^{52,53} |
| LOC105376246 | 9 | rs2722824 | A/C | A | Near gene | |
| NFKB1 | 4 | rs4648110 | A/T | A | Intronic | |
| NFKB2 | 10 | rs11574851 | C/T | T | Asn698Asn | |
| NFKB2 | 10 | rs12769316 | C/T | T | Near gene | |
| NFKB2 PSD | 10 | rs1056890 | C/T | T | Near gene/3'-UTR | |
| NFKB B | 19 | rs3136645 | C/T | C | ncRNA | |
| NLRP3 | 1 | rs4612666 | C/T | T | Intronic | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients ²⁵ |
| REL | 2 | rs13031237 | G/T | T | Intronic | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients ²⁵ |
| REL | 2 | rs842647 | A/G | A | Intronic | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients ⁴² |
| REL | 2 | rs13017599 | A/G | A | Near gene | Overall association with the risk of RA at GWAS level ^{29,54,55} ; Association with RA in ACPA-positive individuals at GWAS level ⁵⁵ ; Association with early-onset psoriasis ⁵⁶ and autoimmune diseases ⁵⁷ in large candidate gene association studies |
| RELA | 11 | rs11820062 | C/T | T | Intronic | Associated with susceptibility to Behcet's disease ⁵⁸ |
| RELA | 11 | rs2306365 | A/G | A | Intronic | Associated with RA and psoriatic arthritis at GWAS level ^{29,59} and in a candidate gene association study ⁶⁰ |
| RELA | 11 | rs7119750 | C/T | T | Intronic | Eosinophil counts ⁴⁸ |
| TLR10 | 4 | rs11096957 | A/C | A | Asn241His | Associated with hip osteoarthritis ^{61,62} and effectiveness of biologics for psoriasis treatment at GWAS level ⁶³ |
| TLR4 | 9 | rs4986791 | C/T | T | Thr399Ile | TLR4:lymphocyte 96 antigen complex level ⁵¹ ; Associated with RA risk and response to anti-TNF drugs ⁵⁴ ; Associated with risk of developing inflammatory bowel disease ⁶⁵ |
| TLR5 | 1 | rs5744174 | C/T | C | Phe616Leu | Associated with response to anti-TNF drugs in RA patients ²⁷ ; Associated with |

| | | | | | | |
|------------|---|-----------|-----|---|-----------|---|
| TLR9//TWF2 | 3 | rs187084 | G/A | T | Near gene | the risk of Crohns disease ⁶⁶ and response to anti-TNF treatment ⁶⁷ ; Associated with response to ustekinumab treatment in psoriasis patients ⁶⁸ |
| TRAF1//C5 | 9 | rs3761847 | A/G | A | Near gene | Associated with psoriatic arthritis risk ⁶⁹ , hip and knee osteoarthritis ^{70,71} , SLE ⁷² and IBD ⁷³ ; associated with the risk of autoimmune thyroid disease ⁷⁴ ; response to anti-TNF therapy in patients with RA ⁶⁴ and IBD ⁷⁵ ; Associated with RA at GWAS level ^{64,76} |

763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region; ncRNA, non-coding Ribonucleic acid. Risk alleles were select according to available GWAS data in order to make possible a meta-analysis of the discovery and replication cohorts.

Table 3. Overall and ACPA-specific associations of NFKB-related polymorphisms and risk of developing RA (discovery population).

| Gene | SNP ID | Chr. | Effect allele | Overall RA (n=2521) 1193 RA / 1328 Controls | | | ACPA ⁺ RA patients (n=1971) 643 RA / 1328 Controls | | | ACPA ⁻ RA patients (n=1593) 265 RA / 1328 Controls | | |
|---------------------|------------------|----------|---------------|---|--------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--------------|---|--|--|
| | | | | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | | | |
| GBP6 | rs928655 | 1 | A | 0.94 (0.81-1.08) | 0.37 | 0.88 (0.74-1.04) | 0.14 | 1.08 (0.84-1.38) | 0.54 | | | |
| IKBKB | rs11986055 | 8 | A | 0.93 (0.71-1.21) | 0.59 | 1.15 (0.83-1.62) | 0.40 | 0.99 (0.65-1.50) | 0.98 | | | |
| IRF4 | rs1050975 | 6 | A | 1.30 (1.04-1.62)[§] | 0.019 | 1.51 (1.14-1.99)[§] | 0.003 | 1.30 (0.91-1.84) | 0.15 | | | |
| IRF4 | rs12203592 | 6 | T | 0.97 (0.81-1.18) | 0.79 | 0.99 (0.78-1.24) | 0.92 | 0.83 (0.60-1.14) | 0.29 | | | |
| IRF4 | rs1877175 | 6 | T | 1.00 (0.86-1.16) | 0.98 | 0.97 (0.80-1.16) | 0.70 | 1.04 (0.82-1.32) | 0.74 | | | |
| IRF4 | rs7768807 | 6 | T | 0.95 (0.83-1.10) | 0.51 | 0.93 (0.78-1.09) | 0.36 | 1.03 (0.82-1.30) | 0.78 | | | |
| KLRC1 | rs7301582 | 12 | T | 1.15 (1.00-1.34)[†] | 0.050 | 1.05 (0.84-1.30) [†] | 0.67 | 1.56 (1.18-2.07)[†] | 0.002 | | | |
| KLRC1 KLRC4 | rs1049174 | 12 | C | 1.18 (0.99-1.41) [†] | 0.068 | 1.09 (0.88-1.35) [†] | 0.42 | 1.38 (1.03-1.84)[†] | 0.031 | | | |
| KLRC1 KLRC4 | rs1154831 | 12 | A | 1.00 (0.86-1.16) | 0.99 | 1.05 (0.88-1.26) | 0.59 | 0.92 (0.71-1.19) | 0.48 | | | |
| KLRC1 KLRC4 | rs2255336 | 12 | A | 1.10 (0.94-1.27) | 0.22 | 1.04 (0.87-1.25) | 0.68 | 1.33 (0.99-1.87) | 0.055 | | | |
| LOC105376246 | rs2722824 | 9 | A | 0.96 (0.83-1.10) | 0.53 | 0.93 (0.79-1.10) | 0.41 | 1.08 (0.86-1.36) | 0.50 | | | |
| NFKB1 | rs4648110 | 4 | A | 1.28 (0.85-1.93) [§] | 0.23 | 1.65 (1.04-2.63)[§] | 0.031 | 0.86 (0.39-2.33) | 0.90 | | | |
| NFKB2 | rs11574851 | 10 | T | 1.17 (0.93-1.48) | 0.19 | 1.39 (1.06-1.83) | 0.017 | 1.02 (0.68-1.53) | 0.93 | | | |
| NFKB2 | rs12769316 | 10 | T | 1.70 (1.04-2.78)[§] | 0.034 | 1.70 (0.95-3.06) [§] | 0.077 | 2.53 (1.24-5.24)[§] | 0.011 | | | |
| NFKB2 PSD | rs1056890 | 10 | T | 0.96 (0.84-1.09) | 0.54 | 0.95 (0.81-1.12) | 0.56 | 1.01 (0.82-1.24) | 0.90 | | | |
| NFKB2 BIB | rs3136645 | 19 | C | 1.07 (0.91-1.24) | 0.42 | 1.15 (0.95-1.38) | 0.14 | 0.81 (0.62-1.05) | 0.10 | | | |
| NLRP3 | rs4612666 | 1 | T | 1.25 (1.05-1.49)[†] | 0.013 | 1.29 (1.04-1.60)[†] | 0.020 | 1.18 (0.89-1.57) | 0.26 | | | |
| REL | rs13031237 | 2 | T | 1.16 (0.91-1.48) [†] | 0.24 | 1.15 (0.85-1.53) [§] | 0.36 | 1.48 (1.02-2.14)[§] | 0.040 | | | |
| REL | rs842647 | 2 | A | 1.08 (0.94-1.24) | 0.30 | 1.10 (0.93-1.31) | 0.27 | 1.05 (0.83-1.33) | 0.68 | | | |
| REL | rs13017599 | 2 | A | 1.06 (0.93-1.20) | 0.40 | 1.04 (0.89-1.21) | 0.64 | 1.17 (0.95-1.44) | 0.13 | | | |
| RELA | rs11820062 | 11 | T | 0.93 (0.82-1.06) | 0.29 | 0.91 (0.78-1.05) | 0.20 | 1.07 (0.88-1.30) | 0.49 | | | |
| RELA | rs2306365 | 11 | A | 1.07 (0.89-1.29) | 0.48 | 1.02 (0.81-1.28) | 0.86 | 1.16 (0.86-1.57) | 0.32 | | | |
| RELA | rs7119750 | 11 | T | 1.09 (0.91-1.32) | 0.34 | 1.04 (0.82-1.30) | 0.76 | 1.24 (0.93-1.65) | 0.15 | | | |
| TLR10 | rs11096957 | 4 | A | 1.12 (0.99-1.27) | 0.066 | 1.13 (0.98-1.32) | 0.10 | 1.08 (0.89-1.32) | 0.43 | | | |
| TLR4 | rs4986791 | 9 | T | 1.17 (0.89-1.54) | 0.25 | 1.15 (0.83-1.60) | 0.40 | 1.00 (0.63-1.57) | 0.99 | | | |
| TLR5 | rs5744174 | 1 | C | 0.99 (0.87-1.13) | 0.86 | 1.03 (0.88-1.20) | 0.75 | 0.89 (0.72-1.10) | 0.27 | | | |
| TLR9 TWRF2 | rs187084 | 3 | T | 0.97 (0.85-1.10) | 0.61 | 0.93 (0.80-1.09) | 0.39 | 1.02 (0.83-1.25) | 0.88 | | | |
| TRAF1 JC5 | rs3761847 | 9 | A | 0.97 (0.85-1.10) | 0.61 | 1.00 (0.86-1.17) | 0.99 | 0.91 (0.74-1.11) | 0.39 | | | |

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

^a Estimates calculated according to an additive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin.[†] 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.

P<0.05 in bold. Data on anti-ccp was missing in 285 patients.

Table 4. Meta-analysis for the association of NFKB- and inflammasome-related polymorphisms and RA risk in ACPA⁺ patients.

| Gene | SNP ID | Chr. | Effect allele | Discovery population ACPA ⁺ RA vs. controls (n=1971) | | Replication DANBIO Registry ACPA ⁺ RA vs. controls (n=1741) | | Meta-analysis ACPA ⁺ RA vs. controls (n=3712) | | I ² |
|--------------|------------|------|---------------|---|--------------|---|--------------|--|---------------|----------------|
| | | | | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | |
| GBP6 | rs928655 | 1 | A | 0.88 (0.74-1.04) | 0.14 | 1.24 (0.97-1.58) | 0.079 | 1.03 (0.74-1.44) | 0.85 | 0.024 |
| IKBKB | rs11986055 | 8 | A | 1.15 (0.83-1.62) | 0.40 | - | - | - | - | - |
| IRF4 | rs1050975 | 6 | A | 1.51 (1.14-1.99)[§] | 0.003 | 0.93 (0.65-1.32) [§] | 0.68 | 1.12 (0.74-1.93) [§] | 0.45 | 0.035 |
| IRF4 | rs12203592 | 6 | T | 0.99 (0.78-1.24) | 0.92 | - | - | - | - | - |
| IRF4 | rs1877175 | 6 | T | 0.86 (0.75-1.01) | 0.065 | 1.06 (0.84-1.33) | 0.61 | 0.93 (0.77-1.15) | 0.52 | 0.13 |
| IRF4 | rs7768807 | 6 | T | 0.93 (0.78-1.09) | 0.36 | - | - | - | - | - |
| KLRC1 | rs7301582 | 12 | T | 1.15 (0.97-1.37) | 0.096 | 0.85 (0.67-1.08) | 0.19 | 1.00 (0.74-1.34) | 1.00 | 0.044 |
| KLRC1 KLRC4 | rs1049174 | 12 | C | 1.06 (0.90-1.25) | 0.45 | 0.95 (0.76-1.19) | 0.66 | - | - | - |
| KLRC1 KLRC4 | rs1154831 | 12 | A | 1.05 (0.88-1.26) | 0.59 | - | - | - | - | - |
| KLRC1 KLRC4 | rs2255336 | 12 | A | 1.04 (0.87-1.25) | 0.68 | - | - | - | - | - |
| LOC105376246 | rs2722824 | 9 | A | 0.93 (0.79-1.10) | 0.41 | - | - | - | - | - |
| NFKB1 | rs4648110 | 4 | A | 1.16 (0.97-1.39) | 0.11 | - | - | - | - | - |
| NFKB2 | rs11574851 | 10 | T | 1.39 (1.06-1.83) | 0.017 | 1.72 (1.14-2.59) | 0.009 | 1.48 (1.18-1.86) | 0.0006 | 0.40 |
| NFKB2 | rs12769316 | 10 | T | 1.70 (0.95-3.06) [§] | 0.077 | 1.91 (0.93-3.92) [§] | 0.080 | 1.78 (1.13-2.80)[§] | 0.013 | 0.81 |
| NFKB2 PSD | rs1056890 | 10 | T | 0.95 (0.81-1.12) | 0.56 | - | - | - | - | - |
| NFKB1B | rs3136645 | 19 | C | 1.15 (0.95-1.38) | 0.14 | - | - | - | - | - |
| NLRP3 | rs4612666 | 1 | T | 1.29 (1.04-1.60)[†] | 0.020 | 1.06 (0.81-1.39) [†] | 0.68 | 1.19 (0.99-1.44) [†] | 0.072 | 0.27 |
| REL | rs13031237 | 2 | T | 1.15 (0.85-1.53) [§] | 0.36 | 1.15 (0.78-1.70) [§] | 0.47 | 1.15 (0.91-1.45) [§] | 0.24 | 1.00 |
| REL | rs842647 | 2 | A | 1.10 (0.93-1.31) | 0.27 | - | - | - | - | - |
| REL | rs13017599 | 2 | A | 1.04 (0.89-1.21) | 0.64 | 1.02 (0.83-1.25) | 0.86 | 1.03 (0.91-1.17) | 0.61 | 0.88 |
| RELA | rs11820062 | 11 | T | 0.91 (0.78-1.05) | 0.20 | - | - | - | - | - |
| RELA | rs2306365 | 11 | A | 1.02 (0.81-1.28) | 0.86 | - | - | - | - | - |
| RELA | rs7119750 | 11 | T | 1.04 (0.82-1.30) | 0.76 | - | - | - | - | - |
| TLR10 | rs11096957 | 4 | A | 1.13 (0.98-1.32) | 0.10 | 0.75 (0.60-0.93) | 0.010 | 0.93 (0.62-1.39) | 0.72 | 0.002 |
| TLR4 | rs4986791 | 9 | T | 1.15 (0.83-1.60) | 0.40 | - | - | - | - | - |
| TLR5 | rs5744174 | 1 | C | 1.03 (0.88-1.20) | 0.75 | - | - | - | - | - |
| TLR9 ITWF2 | rs187084 | 3 | T | 0.93 (0.80-1.09) | 0.39 | - | - | - | - | - |
| TRAF1 IC5 | rs3761847 | 9 | A | 1.00 (0.86-1.17) | 0.99 | - | - | - | - | - |

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

^a A random effect model was assumed for the meta-analysis of both cohorts.[†] Estimates calculated according to an additive model of inheritance and adjusted for age and sex.[§] Estimates calculated according to a dominant model of inheritance and adjusted for age and sex.[§] Estimates calculated according to a recessive model of inheritance and adjusted for age and sex.

P<0.05 in boldface.

792

793

794

795

796

797

798

799

800 **Table 5.** Overall and ACPA-stratified haplotype association analysis for RA.

801

| NFKB2 | rs11574851 | | rs12769316 | | RA patients (n=4210) | | ACPA-positive patients (n=3117) | | ACPA-negative patients (n=2688) | | | | |
|-------|------------|---|------------|---|-------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------|---------------------------------------|---------------|--------|--------------------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P | Freq | OR (95% CI) | P |
| | C | C | T | T | 0.8181 | 1.00 | --- | 0.8224 | 1.00 | --- | 0.8295 | 1.00 | --- |
| | C | T | T | C | 0.1139 | 1.14 (0.99 - 1.31) | 0.066 | 0.1706 | 1.10 (0.92 - 1.32) | 0.30 | 0.1088 | 1.02 (0.79 - 1.30) | 0.91 |
| | T | T | C | C | 0.0571 | 1.18 (0.98 - 1.42) | 0.13 | 0.0530 | 1.39 (1.11 - 1.74) | 0.0042 | 0.0538 | 1.04 (0.75 - 1.44) | 0.82 |
| | T | C | C | T | 0.0109 | 2.21 (1.37 - 3.56) | 0.0011 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

802

803 † Estimates calculated according to a dominant model.

804 Minimum haplotype frequency was set at 0.01. P<0.05 in bold.

805

806

807

808

809

810

811

812

813

815 **Table 6.** Meta-analysis for the association of *NFKB*-related polymorphisms and relative change of DAS28 score (Δ DAS28).

| Gene | SNP ID | Chr. | Effect allele | Discovery population (n=604) | | | Replication DREAM registry (n=882) | | | Replication DANBIO Registry (n=621) | | | Meta-analysis (n=2107) | | |
|--------------|------------|------|---------------|------------------------------|--------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|--------------------------|------------------------|----------------|--|
| | | | | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | OR (95% CI) ^a | P | I ² | |
| GBP6 | rs928655 | 1 | A | 1.05 (0.87-1.27) | 0.61 | 0.90 (0.80-1.00) | 0.058 | ND | ND | 0.95 (0.82-1.10) | 0.52 | 0.17 | | | |
| IKKB | rs11986055 | 8 | A | 0.74 (0.48-1.11) | 0.14 | 0.85 (0.66-1.07) | 0.17 | 0.94 (0.64-1.39) | 0.76 | 0.85 (0.71-1.02) | 0.074 | 0.71 | | | |
| IRF4 | rs1050975 | 6 | A | 0.95 (0.72-1.24) | 0.69 | 0.99 (0.83-1.17) | 0.87 | 1.24 (0.94-1.65) | 0.13 | 1.03 (0.90-1.18) | 0.67 | 0.33 | | | |
| IRF4 | rs12203592 | 6 | T | 1.01 (0.77-1.33) | 0.93 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | | | |
| IRF4 | rs1877175 | 6 | T | 1.09 (0.90-1.33) | 0.37 | 0.92 (0.82-1.13)* | 0.15 | 0.90 (0.75-1.09) | 0.30 | 0.96 (0.86-1.07) | 0.47 | 0.31 | | | |
| IRF4 | rs7768807 | 6 | T | 0.86 (0.72-1.03) | 0.10 | 1.04 (0.93-1.16)* | 0.52 | ND | ND | 0.96 (0.80-1.15) | 0.65 | 0.08 | | | |
| KLRC1 | rs7301582 | 12 | T | 1.05 (0.86-1.27) | 0.62 | 1.00 (0.88-1.12) | 0.94 | 0.99 (0.80-1.22) | 0.92 | 1.00 (0.92-1.11) | 0.85 | 0.90 | | | |
| KLRC1 KLR4 | rs1049174 | 12 | C | 1.08 (0.91-1.29) | 0.37 | 0.96 (0.86-1.08) | 0.53 | 1.07 (0.90-1.27) | 0.47 | 1.01 (0.93-1.10) | 0.79 | 0.42 | | | |
| KLRC1 KLR4 | rs1154831 | 12 | A | 0.89 (0.73-1.10) | 0.28 | 1.05 (0.93-1.19)* | 0.40 | ND | ND | 0.99 (0.84-1.16) | 0.88 | 0.18 | | | |
| KLRC1 KLR4 | rs2255336 | 12 | A | 1.09 (0.90-1.33) | 0.38 | 1.01 (0.89-1.16) | 0.81 | ND | ND | 1.04 (0.93-1.15) | 0.54 | 0.53 | | | |
| LOC105376246 | rs2722824 | 9 | A | 1.03 (0.86-1.23) | 0.77 | 0.94 (0.85-1.05) | 0.32 | ND | ND | 0.96 (0.88-1.05) | 0.41 | 0.39 | | | |
| NFKB1 | rs4648110 | 4 | A | 1.07 (0.88-1.29) | 0.51 | 1.00 (0.89-1.13)* | 0.95 | ND | ND | 1.02 (0.92-1.13) | 0.71 | 0.56 | | | |
| NFKB2 | rs11574851 | 10 | T | 0.97 (0.73-1.29) | 0.83 | 0.92 (0.72-1.18)* | 0.53 | 0.78 (0.57-1.06) | 0.11 | 0.90 (0.76-1.05) | 0.18 | 0.57 | | | |
| NFKB2 | rs12769316 | 10 | T | 0.92 (0.75-1.13) | 0.43 | ND | ND | 0.86 (0.70-1.06) | 0.16 | 0.89 (0.77-1.03) | 0.12 | 0.65 | | | |
| NFKB2 IPSD | rs1056890 | 10 | T | 1.22 (1.03-1.44) | 0.025 | 1.08 (0.98-1.19) | 0.11 | 1.31 (1.10-1.57) | 0.0030 | 1.18 (1.05-1.33) | 0.0077 | 0.12 | | | |
| NFKB B | rs3136645 | 19 | C | 0.90 (0.73-1.11) | 0.34 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | | | |
| NLRP3 | rs4612666 | 1 | T | 1.05 (0.87-1.25) | 0.62 | 1.20 (1.05-1.37)* | 0.006 | 0.96 (0.80-1.14) | 0.62 | 1.08 (0.94-1.23) | 0.28 | 0.13 | | | |
| REL | rs13031237 | 2 | T | 1.07 (0.91-1.26) | 0.40 | 1.03 (0.94-1.14) | 0.49 | 1.08 (0.92-1.28) | 0.36 | 1.05 (0.97-1.13) | 0.21 | 0.86 | | | |
| REL | rs842647 | 2 | A | 1.03 (0.86-1.24) | 0.72 | 0.96 (0.87-1.06) | 0.45 | ND | ND | 0.98 (0.89-1.06) | 0.57 | 0.51 | | | |
| REL | rs13017599 | 2 | A | 1.07 (0.91-1.27) | 0.41 | 1.03 (0.94-1.14) | 0.50 | 1.03 (0.86-1.21) | 0.78 | 1.04 (0.96-1.12) | 0.33 | 0.92 | | | |
| RELA | rs11820062 | 11 | T | 1.07 (0.90-1.26) | 0.45 | 0.92 (0.84-1.01)* | 0.081 | ND | ND | 0.98 (0.84-1.13) | 0.74 | 0.12 | | | |
| RELA | rs2306365 | 11 | A | 0.91 (0.71-1.16) | 0.45 | 1.19 (1.03-1.37) | 0.021 | ND | ND | 1.06 (0.82-1.38) | 0.66 | 0.064 | | | |
| RELA | rs7119750 | 11 | T | 0.93 (0.73-1.18) | 0.54 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | | | |
| TLR10 | rs11096957 | 4 | A | 1.00 (0.85-1.19) | 0.98 | 0.99 (0.89-1.09) | 0.80 | ND | ND | 0.99 (0.91-1.08) | 0.87 | 0.92 | | | |
| TLR4 | rs4986791 | 9 | T | 1.15 (0.78-1.70) | 0.47 | 1.18 (0.98-1.41)* | 0.077 | ND | ND | 1.18 (1.00-1.39) | 0.056 | 0.91 | | | |
| TLR5 | rs5744174 | 1 | C | 0.99 (0.83-1.17) | 0.89 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | | | |
| TLR9 TWF2 | rs187084 | 3 | T | 1.02 (0.86-1.21) | 0.81 | 0.98 (0.88-1.08)* | 0.67 | ND | ND | 0.99 (0.91-1.08) | 0.83 | 0.69 | | | |
| TRAF1 JC5 | rs3761847 | 9 | A | 1.08 (0.91-1.29) | 0.37 | 1.05 (0.95-1.16) | 0.33 | ND | ND | 1.04 (0.96-1.14) | 0.35 | 0.77 | | | |

816

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

818 A random effect model was assumed for the meta-analysis of both cohorts.

819 ^a Estimates calculated according to an additive model of inheritance and adjusted for age, sex and country of origin (or age and sex in the replication stages).

820 * Estimates based on imputed genotypes. P<0.05 in boldface. No significant heterogeneity (heterogeneity chi-squared) was observed in any meta-analysis reported above.

821

822

823

824

825 **FIGURE LEGENDS**

826 **Figure 1.** Association of the *NFKB2*_{rs11574851} SNP with the risk of RA in ACPA-positive
827 patients.

828
829 Association estimates according a random effect model. **P=0.0006**

830

831 **Figure 2.** Meta-analysis of the association of the *NFKB2*_{rs1056890} SNP with response to TNFi
832 [A] and correlation with higher levels of IL10 after stimulation of PBMCs (n=377) with LPS
833 [B].

834

835
836 [A] Association estimates according to a random effect model. **P_{Meta}=0.0077.**

837 [B] Correlation with IL10 was analysed using genotype data of the *NFKB2*_{rs1005044} SNP, a marker in
838 strong LD with the rs1056890 ($r^2=1.00$).

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

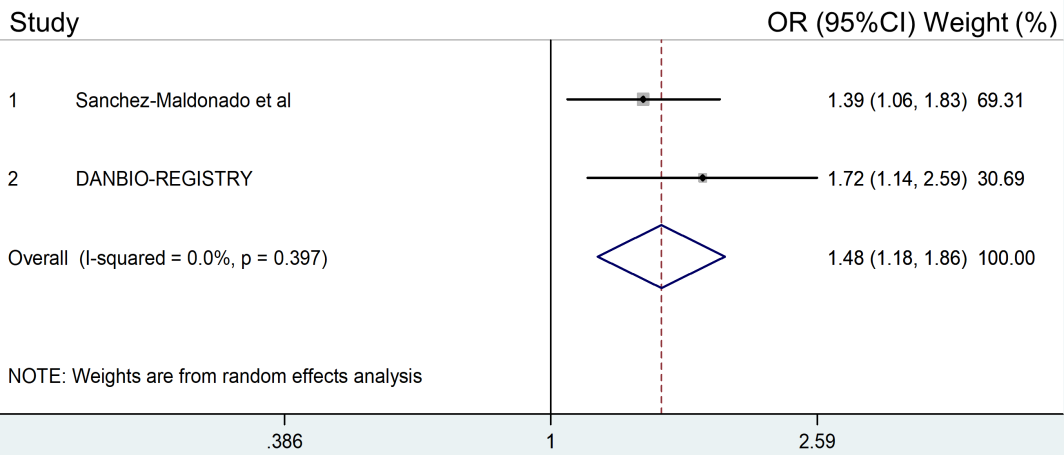
852

853

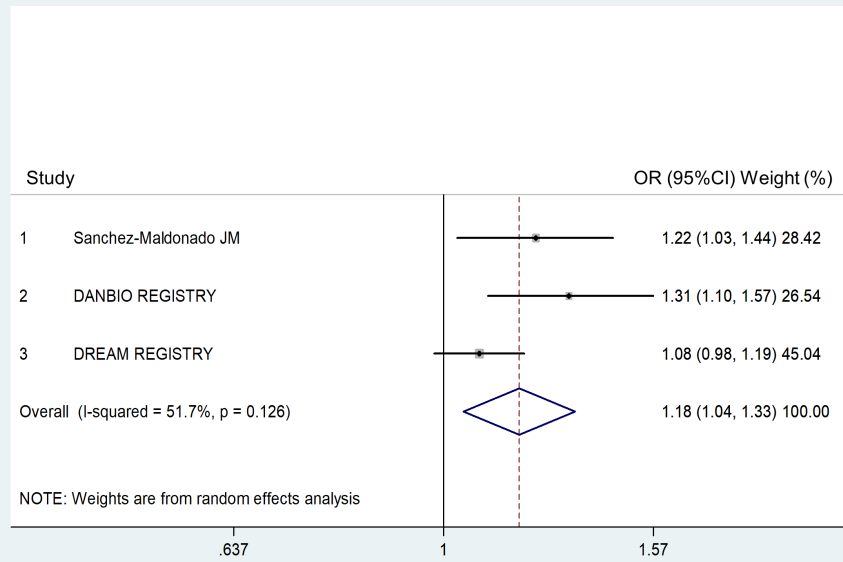
854

855

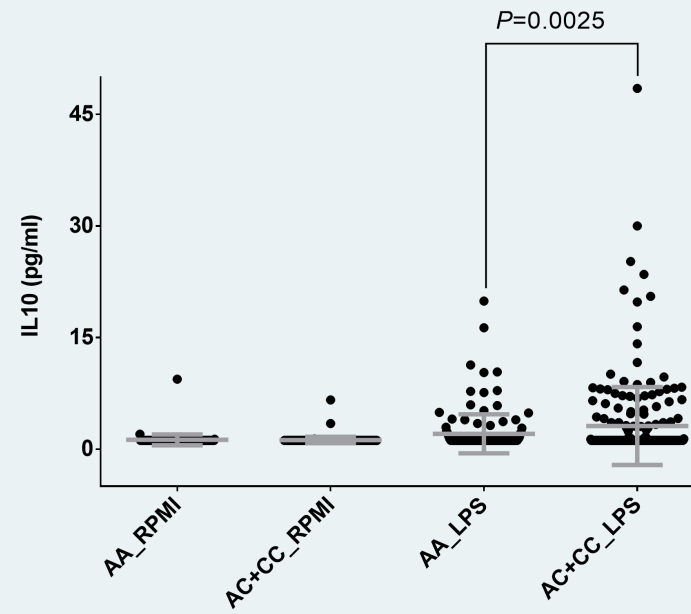
856



[A]



[B]



1 Validation of GWAS-identified variants for anti-TNF drug response in 2 rheumatoid arthritis: a meta-analysis of two large cohorts

3 Jose Manuel Sánchez-Maldonado^{1,2,3}, Rafael Cáliz^{1,3,4}, Miguel Ángel López Nevot^{3,5}, Antonio
4 José Cabrera-Serrano^{1,2,3}, Ana Moñiz-Díez^{1,2,3}, Helena Canhão^{6,7}, Rob ter Horst⁸, Luca
5 Quartuccio⁹, Signe B Sorensen^{10,11}, Bente Glintborg^{12,13}, Merete Lund Hetland^{12,13}, Ileana
6 Filipescu¹⁴, Eva Pérez-Pampin¹⁵, Pablo Conesa-Zamora¹⁶, Jerzy Swierkot¹⁷, Alfons A den
7 Broeder¹⁸, Salvatore De Vita⁹, Eva Rabing Brix Petersen¹⁹, Yang Li^{8,20}, Miguel A. Ferrer³,
8 Alejandro Escudero²¹, Mihai G. Netea^{8,22}, Marieke J. H. Coenen²³, Vibeke Andersen^{9,10,24}, João
9 E. Fonseca^{25,26}, Manuel Jurado^{1,2,3}, Bogunia-Kubik K²⁷, Eduardo Collantes²¹, Juan Sainz^{1,2,3,28}

- 10 1 Genomic Oncology Area, GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of
11 Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain
- 12 2 Hematology department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain
- 13 3 Instituto de Investigación Biosanitaria IBs.Granada, Granada, Spain
- 14 4 Department of Rheumatology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain
- 15 5 Immunology department. Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain
- 16 6 EpiDoC Unit, CEDOC, NOVA Medical School and National School of Public Health, Universidade Nova de
17 Lisboa, Lisbon, Portugal.
- 18 7 Comprehensive Health Research Center (CHRC), NOVA Medical School, Lisbon, Portugal
- 19 8 Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University
20 Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands
- 21 9 Department of Medical Area, Clinic of Rheumatology, University of Udine, Italy.
- 22 10 Molecular Diagnostic and Clinical Research Unit, IRS-Center Sonderjylland, University Hospital of
23 Southern Jutland, DK-6200 Aabenraa, Denmark
- 24 11 Institute of Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense,
25 Denmark
- 26 12 The DANBIO registry, The Danish Rheumatologic Biobank and Copenhagen Center for Arthritis Research
27 (COPECARE), Center for Rheumatology and Spine Diseases, Centre of Head and Orthopaedics,
28 Rigshospitalet, Glostrup, Denmark
- 29 13 Department of Clinical Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen,
30 Copenhagen, Denmark
- 31 14 Rheumatology department, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca, Romania
- 32 15 Rheumatology Unit, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain
- 33 16 Clinical Analysis department, Santa Lucía University Hospital, Cartagena, Spain
- 34 17 Department of Rheumatology and Internal Medicine, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland
- 35 18 Radboud University Medical Center, Radboud Institute for Health Sciences, Department of Rheumatology,
36 Nijmegen, The Netherlands.
- 37 19 Department of Biochemistry and Immunology. University Hospital of Southern Jutland, Aabenraa,
38 Denmark.
- 39 20 Centre for Individualised Infection Medicine (CiiM) & TWINCORE, joint ventures between the Helmholtz-
40 Centre for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany
- 41 21 Rheumatology department, Reina Sofía Hospital/IMIBIC/University of Córdoba, Córdoba, Spain
- 42 22 Department for Immunology & Metabolism, Life and Medical Sciences Institute (LIMES), University of Bonn,
43 53115 Bonn, Germany
- 44 23 Radboud University Medical Center, Radboud Institute for Health Sciences, Department of Human
45 Genetics, Nijmegen, The Netherlands.
- 46 24 Institute of Regional Research, Faculty of Health Sciences, University of Southern Denmark, Odense,
47 Denmark
- 48 25 Rheumatology and Metabolic Bone Diseases Department, Hospital de Santa Maria, CHLN, Lisbon,
49 Portugal
- 50 26 Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon,
51 Lisbon Academic Medical Center, Lisbon, Portugal

52 ²⁷ Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław,
53 Poland

54 ²⁸ Department of Medicine, University of Granada, Granada

55
56 * **Correspondence:**
57 Corresponding Author
58 Juan Sainz, PhD
59 Genomic Oncology Area
60 GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada /
61 Andalusian Regional Government, PTS Granada
62 Avda. de la Ilustración, 114
63 18016 Granada, Spain
64 Phone: +34-958-715500
65 Fax: +34-958-637071
66 E-mail: juan.sainz@genyo.es

67 **Keywords:** GWAS, genetic variants, rheumatoid arthritis, drug response, TNF inhibitors

68 Abstract

69 We aimed to validate the association of 28 GWAS-identified genetic variants for response to TNF
70 inhibitors (TNFi) in a discovery cohort of 1361 rheumatoid arthritis (RA) patients monitored in routine
71 care and ascertained through the REPAIR consortium and DANBIO registry. We genotyped selected
72 markers and evaluated their association with response to TNFi after 6 months of treatment according
73 to the change in disease activity score 28 (Δ DAS28). Next, we confirmed the most interesting results
74 through meta-analysis of our data with those from the DREAM cohort that included 706 RA patients
75 treated with TNFi. The meta-analysis of the discovery cohort and DREAM registry including 2067 RA
76 patients revealed an overall association of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP with a lower improvement in
77 DAS28 that remained significant after correction for multiple testing (per-allele $OR_{Meta}=0.83$,
78 $P_{Meta}=0.000077$; $P_{Het}=0.61$). In addition, we found that each copy of the *LRRC55*_{rs717117G} allele was
79 significantly associated with lower improvement in DAS28 in RF-positive patients (per-allele
80 $OR_{Meta}=0.67$, $P=0.00058$; $P_{Het}=0.06$) whereas an opposite but not significant effect was detected in
81 RF-negative subjects (per-allele $OR_{Meta}=1.38$, $P=0.10$; $P_{Het}=0.45$; $P_{Interaction}=0.00028$). Interestingly,
82 although the identified associations did not survive multiple testing correction, the meta-analysis also
83 showed overall and rheumatoid factor (RF)-specific associations for the *MAFB*_{rs6071980} and
84 *CNTN5*_{rs1813443} SNPs with decreased changes in DAS28 (per-allele $OR_{Meta_rs6071980}=0.85$, $P=0.0059$;
85 $P_{Het}=0.63$ and $OR_{Meta_rs1813443_RF+}=0.81$, $P=0.0059$; $P_{Het}=0.69$ and $OR_{Meta_rs1813443_RF-}=1.00$, $P=0.99$;
86 $P_{Het}=0.12$; $P_{Interaction}=0.032$). Mechanistically, we found that subjects carrying the *LINC02549*_{rs7767069T}
87 allele had significantly increased numbers of CD45RO⁺CD45RA⁺ T cells ($P=0.000025$) whereas
88 carriers of the *LINC02549*_{rs7767069T/T} genotype showed significantly increased levels of soluble
89 scavengers CD5 and CD6 in serum ($P=0.00037$ and $P=0.00041$). In addition, carriers of the
90 *LRRC55*_{rs717117G} allele showed decreased production of IL6 after stimulation of PBMCs with *B*
91 *burgdorferi* and *E coli* bacteria ($P=0.00046$ and $P=0.00044$), which suggested a reduced IL6-mediated
92 anti-inflammatory effect of this marker to worsen the response to TNFi. In conclusion, this study
93 confirmed the influence of the *LINC02549* and *LRRC55* loci to determine the response to TNFi in RA
94 patients and suggested a weak effect of the *MAFB* and *CNTN5* loci that need to be further investigated.

95

96

97 1 Introduction

98 Although rheumatoid arthritis (RA) remains as a chronic and incurable autoimmune disease that occurs
99 in as much as 0.5-1% of the general population (Scott et al., 2010), the introduction of biological agents
100 has substantially improved the signs and symptoms of the disease by reducing joint pain and damage
101 and disability in early and longstanding RA (Pisetsky and Ward, 2012). The increasing number of
102 biological agents approved by the FDA and the increased prevalence of the disease all around the world
103 (Safiri et al., 2019) have placed a substantial economic burden for health care systems. Although the
104 introduction of biosimilars in clinical practice reduced the cost of these treatments in many countries
105 (Tesar et al., 2020), there is still an unmet need to optimize biologic therapies, avoiding unnecessary
106 adverse effects risks and reducing costs (Atzeni et al., 2013).

107 The interplay between genetics and drug response has been the subject of intense investigations during
108 last decades. Response to biologics has been shown to vary between individuals and that a large
109 proportion of patients show no clinical improvement (Plenge and Bridges, 2011). Given the high cost
110 of these drugs and the potential impairment of non-responding patients, the identification of genetic
111 biomarkers associated with drug response to specific biological agents would help to know which
112 patients might benefit from a particular treatment. However, to date, only a few genome-wide
113 association studies (GWAS) (Liu et al., 2008;Plant et al., 2011;Krintel et al., 2012b;Cui et al.,
114 2013;Umicevic Mirkov et al., 2013;Honne et al., 2016;Julia et al., 2016) or well powered candidate
115 gene association studies have been conducted (Potter et al., 2010;Canet et al., 2015a;Canet et al.,
116 2015b;Canhao et al., 2015;Sode et al., 2015;Sode et al., 2018;Canet et al., 2019;Sanchez-Maldonado
117 et al., 2019;Manuel Sanchez-Maldonado et al., 2020). We are far from being able to optimize drug
118 dosing or prioritize drug combinations based on genetic findings. In fact, attempts to validate the
119 association of most of the genetic markers identified in these association studies have failed (Suarez-
120 Gestal et al., 2010), which confirms the limited application of genetic findings in a clinical setting.
121 Considering that the validation of previous GWAS findings is an essential step to tailor treatments for
122 RA and to approach personalized medicine, we aimed to validate the association of GWAS-identified
123 variants for response to TNF inhibitors (TNFi) in a two-stage nested case-control association study
124 including a cohort of 1361 anti-TNF naïve RA patients ascertained through the REPAIR consortium
125 and DANBIO registry and an independent replication cohort of 706 RA patients treated with TNFi
126 from the DREAM registry. We also investigated whether the effect of selected markers on the response
127 to TNFi could be modified by rheumatoid factor (RF) status, and whether genetic variants could
128 influence immune responses and affect the serological concentration of 108 plasmatic inflammatory
129 proteins, 7 serum steroid hormones or counts of 91 blood-derived immune cell populations.

130 2 Material and Methods

131 2.1 Study populations and response to TNFi

132 The discovery population consisted of 1361 RA patients ascertained through the REPAIR consortium
133 and the DANBIO registry (Table 1) (Ibfeft et al., 2016;Ibfeft et al., 2017). RA patients fulfilled the
134 1987 revised American College of Rheumatology (ACR) (Arnett et al., 1988) and/or the ACR/EULAR
135 2010 classification criteria (Aletaha et al., 2010). In order to further replicate the most interesting
136 results, we validated the association with response to anti-TNF drugs of those SNPs showing a $P < 0.05$
137 in the discovery cohort in 706 Dutch RA patients treated with TNFi from the DREAM (Dutch
138 Rheumatoid Arthritis Monitoring) registry (Supplementary Table 1). The study followed the
139 Declaration of Helsinki. Study participants were of European origin and gave their written informed
140 consent to participate in the study, which was approved by the ethical review committee of participant

141 institutions: Virgen de las Nieves University Hospital (2012/89); Santa Maria Hospital-CHLN (CE
142 877/121.2012); University Clinical Hospital of Santiago de Compostela (2013/156); Wroclaw Medical
143 University (KB-625/2016); Radboud university medical center (2011/299) and by the Regional Ethics
144 Committee of Central Denmark Region (S-20120113). A detailed description of the discovery
145 population has been reported elsewhere (Canet et al., 2015b;Canet et al., 2019;Sanchez-Maldonado et
146 al., 2019;Manuel Sanchez-Maldonado et al., 2020). Response to TNFi for each patient in all study
147 populations was calculated using the change in disease activity score (DAS28CRP) between baseline
148 and 6 months after treatment. Overall and RF-stratified linear regression analyses adjusted for age, sex
149 and country of origin were used to determine the association between GWAS-identified SNPs and
150 changes in DAS28. RA patients with missing values either for DAS28 (in at the time points of interest)
151 or RF were not included in the analysis.

152 **2.2 DNA extraction, SNP selection, genotyping and quality control**

153 Genomic DNA from RA patients was extracted from blood samples using the QIAamp DNA Blood
154 Mini kit (Valencia, CA, EEUU) according to manufacturer's instructions. The single-nucleotide
155 polymorphisms (SNPs) were selected through an extensive literature search of relevant GWAS and
156 meta-analyses published by February 2019 using publicly available online databases. Additional
157 criteria were potential functionality and linkage disequilibrium between the reported SNPs. Biological
158 function was predicted according to the data publicly available in the integrated Regulome database
159 (www.regulomedb.org), and eQTL data browsers (www.gtexportal.org/home/ and
160 <https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>). A total of 28 SNPs in 25 genes were selected for
161 genotyping in the discovery cohort (Table 2). Genotyping of selected SNPs was performed using
162 KASP® probes according to manufacturer's instructions (LGC Genomics, Hoddesdon, UK). For
163 quality control, ~5% of DNA samples were randomly included as duplicates and concordance between
164 duplicate samples was $\geq 99.0\%$. Replication of the most interesting association was conducted in the
165 DREAM registry (n=706) following a similar quality control genotyping strategy.

166 **2.3 Hardy-Weinberg Equilibrium, genetic association analysis and meta-analysis**

167 Deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was tested in the control group (responders and
168 moderate responders according to the EULAR response criteria) by chi-square (χ^2), and linear
169 regression analysis adjusted for age, sex and country of origin was used to assess the associations of
170 the GWAS-identified polymorphisms with absolute changes in DAS28 assuming log-additive,
171 dominant and recessive models of inheritance. Those SNPs with the lowest P-value in the discovery
172 population according to each genetic model were advanced for replication in the DREAM cohort and
173 meta-analysis of the discovery and replication populations using a fixed effect model was performed
174 to validate the association observed. I² statistic was used to assess heterogeneity between studies.
175 Correction for multiple testing was performed using the Bonferroni method but also considering the
176 two inheritance models tested. Given that log-additive and dominant models showed a high degree of
177 collinearity, the significant threshold for the meta-analysis was set to 0.00089 considering log-
178 additive/dominant and recessive inheritance models (0.05/28SNPs/2models). Overall statistical power
179 was calculated using Quanto (v.12.4) assuming a log-additive model and a baseline risk of 30% for
180 response to TNFi (Weinblatt et al., 1999;Keystone et al., 2004).

181 **2.4 Cell isolation, differentiation and cytokine quantitative trait loci (cQTL) and hormone** 182 **analysis in relation to the GWAS-identified variants for response to TNFi**

183 With the aim of determining whether those SNPs associated with response to TNFi had a role in
184 modulating immune responses, we performed in vitro stimulation experiments and measured cytokine

185 production (IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, TNF α , IL17, and IL22) after stimulation of peripheral
186 blood mononuclear cells (PBMCs), whole blood or monocyte-derived macrophages (MDMs) from 408
187 healthy subjects of the 500FG cohort from the Human Functional Genomics Project (HFGP) with LPS
188 (1 or 100 ng/ml), PHA (10 μ g/ml), Pam3Cys (10 μ g/ml), CpG (ODN M362; 10 μ g/ml) and *B.*
189 *burgdorferi* and *E. coli*, as experimental model for cytokine production capacity. Given the sex
190 disparities in the prevalence and course of RA and the impact of steroid hormones in modulating
191 immune responses, we also evaluated the correlation of SNPs with serum levels of 7 steroid hormones
192 (androstenedione, cortisol, 11-deoxy-cortisol, 17-hydroxy progesterone, progesterone, testosterone
193 and 25 hydroxy vitamin D3) in a subset of the 500FG cohort without hormonal replacement therapy or
194 oral contraceptives (n=280). After log transformation, cytokine or serum steroid hormone levels were
195 correlated with the SNPs of interest using a linear regression model with age and sex as co-factors in
196 R (<http://www.r-project.org/>). This analysis led to cytokine quantitative trait loci (cQTL) and hormone
197 quantitative trait loci (hQTL). Significance thresholds were set to be 0.000463 and 0.00357
198 (0.05/6stimulants/9cytokines or 0.05/7hormones and 2 inheritance models) for cQTL and hQTL,
199 respectively.

200 **2.5 Correlation between GWAS-identified polymorphisms and cell counts of 91 blood-derived** 201 **immune cell populations and serum/plasmatic proteomic profile**

202 We also investigated whether selected polymorphisms had an impact on blood cell counts by analyzing
203 a set of 91 manually annotated immune cell populations and genotype data from the 500FG cohort that
204 consisted of 408 healthy subjects (Supplementary Table 2). Cell populations were measured by 10-
205 color flow cytometry (Navios flow cytometer, Beckman Coulter) after blood sampling (2-3 hours) and
206 cell count analysis was performed using the Kaluza software (Beckman Coulter, v.1.3). In order to
207 reduce inter-experimental noise and increase statistical power, cell count analysis was performed by
208 calculating parental and grandparental percentages, which were defined as the percentage of a certain
209 cell type within the cell-populations one or two levels higher in the hierarchical definitions of cell sub-
210 populations (Orru et al., 2013). Detailed laboratory protocols for cell isolation, reagents, gating and
211 flow cytometry analysis have been reported elsewhere (Aguirre-Gamboa et al., 2016) and the accession
212 number for the raw flow cytometry data and analyzed data files are available upon request to the authors
213 (<http://hfgp.bbmri.nl>). A proteomic analysis was also performed in serum and plasma samples from
214 the 500FG cohort. Circulating proteins were measured using the commercially Olink® Inflammation
215 panel (Olink, Sweden) that resulted in the measurement of 103 different biomarkers (Supplementary
216 Table 3). Proteins levels were expressed on a log₂-scale as normalized protein expression values, and
217 normalized using bridging samples to correct for batch variation. Considering the number of proteins
218 (n=103) and cell populations (n=91) tested, *P*-values of 0.00049 and 0.00055 were set as significant
219 thresholds for the proteomic and cell-level variation analysis, respectively.

220 **3 Results**

221 A total of 1361 anti-TNF patients were included in the discovery population. The mean age of the RA
222 patients was 52 \pm 14 and they showed a female/male ratio of 3.4 (1050/310). Sixty-seven percent of the
223 RA patients were positive for RF and 64% had anti-citrullinated protein antibodies (ACPA). The
224 median disease duration was of 12.92 years and the disease activity score 28 (DAS28CRP) calculated
225 at patient recruitment was of 5.91 (Table 1).

226 **3.1 Association of GWAS-identified SNPs with response to anti-TNF drugs**

227 All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group (responders according to EULAR
228 response criteria; *P*>0.001) and showed a high genotyping call rate (>90%) with the exception of the

229 *LINC01387*_{rs4411591} SNP that was excluded from the statistical analysis. The overall linear regression
 230 analysis of the discovery cohort including 1361 RA patients treated with TNFi showed that the
 231 *MAFB*_{rs6028945}, *MAFB*_{rs6071980}, *LINC02549*_{rs7767069}, and *LRRC55*_{rs717117} SNPs had an overall significant
 232 effect on the response to TNFi at $P < 0.05$ level ($OR_{\text{Dominant}} = 0.81$, 95% CI 0.68-0.97, $P = 0.020$; per-allele
 233 $OR = 0.83$, 95% CI 0.72-0.97, $P = 0.020$; per-allele $OR = 0.85$, 95% CI 0.76-0.96, $P = 0.008$; per-allele
 234 $OR = 0.76$, 95% CI 0.60-0.97, $P = 0.026$; Table 3). Importantly, the meta-analysis of the discovery and
 235 replication cohorts confirmed the overall association of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP with lower DAS28
 236 improvement that remained significant after multiple testing correction (per-allele $OR_{\text{Meta}} = 0.83$,
 237 95% CI 0.76-0.91, $P_{\text{Meta}} = 0.000077$; $P_{\text{Het}} = 0.61$; Table 4). Although it did not survive multiple testing
 238 correction, the meta-analysis also showed a potentially interesting overall associations for the
 239 *MAFB*_{rs6071980} SNP with less DAS28 improvement (per-allele $OR_{\text{Meta}_{rs6071980}} = 0.85$, 95% CI 0.76-0.95,
 240 $P = 0.0059$; $P_{\text{Het}} = 0.63$; Table 4).

241 A RF-stratified analysis showed a RF-specific association for the *LRRC55*_{rs717117} SNP with response
 242 to TNFi that remained statistically significant after correction for multiple testing in the discovery
 243 population. Thus, RF-positive RA patients carrying the *LRRC55*_{rs717117G} allele additively decreased the
 244 drop in DAS28 (per-allele $OR = 0.54$, 95% CI 0.39-0.74, $P = 0.00012$) whereas RF-negative RA patients
 245 showed an opposite but not statistically significant effect (per-allele $OR = 1.52$, 95% CI 0.96-2.42,
 246 $P = 0.07$; $P_{\text{Interaction}} = 0.00028$; Table 3). Interestingly, the meta-analysis of our data with those from the
 247 DREAM registry including 2067 RA patients confirmed the RF-specific effect of this SNP to modulate
 248 the response to anti-TNF drugs (per-allele $OR_{\text{Meta}_{RF+}} = 0.67$, 95% CI 0.54-0.84, $P_{\text{Meta}} = 0.00058$;
 249 $P_{\text{Het}} = 0.06$ and per-allele $OR_{\text{Meta}_{RF-}} = 1.38$, 95% CI 0.94-2.02, $P = 0.10$; $P_{\text{Het}} = 0.45$; $P_{\text{Interaction}} = 0.00028$;
 250 Table 4). Although it did not survive multiple testing, the meta-analysis also showed potentially
 251 interesting RF-specific association for the *CNTN5*_{rs1813443} SNP with a decreased drop in DAS28
 252 ($OR_{\text{Meta}_{rs1813443}_{RF+}} = 0.81$, 95% CI 0.70-0.94, $P = 0.0059$; $P_{\text{Het}} = 0.69$ and $OR_{\text{Meta}_{rs1813443}_{RF-}} = 1.00$,
 253 95% CI 0.79-1.27, $P = 0.99$; $P_{\text{Het}} = 0.12$; $P_{\text{Interaction}} = 0.032$; Table 4).

254 3.2 Functional characterization of the most interesting findings

255 Considering these results, we attempted to shed some light into the functional consequences of the
 256 overall or RF-specific effects of the *LINC02549*_{rs7767069}, *LRRC55*_{rs717117}, *MAFB*_{rs6071980} and
 257 *CNTN5*_{rs1813443} SNPs to modulate the response to TNFi. Interestingly, our functional experiments
 258 showed that, when considering the total number of leukocytes as reference, the *LINC02549*_{rs7767069}
 259 polymorphism significantly correlated with increased numbers of CD45RO+CD45RA+ T cells in
 260 blood ($P = 0.00047$; Figure 1A). Subjects carrying the *LINC02549*_{rs7767069T} allele (associated with poor
 261 response to TNFi in RA patients) had significantly increased numbers of CD45RO+CD45RA+ T cells
 262 ($P = 0.000025$), which suggested that this genetic marker might influence the response to TNFi by
 263 mediating the number of this specific T cell subset in blood and, thereby contribute to inflammation.
 264 In addition, we observed that those subjects carrying two copies of the *LINC02549*_{rs7767069T} allele
 265 showed significantly increased serum levels of soluble scavenger receptors CD5 and CD6 when
 266 compared with those carrying the A/T or A/A genotypes ($P = 0.00037$ and $P = 0.00041$; Figure 1B and
 267 1C). These results also suggested a functional role of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP in RA likely through
 268 the CD5/CD6-mediated modulation of T cells and certain subsets of B cells that control multiple
 269 processes including cellular adhesion and migration across endothelial and epithelial cells, antigen
 270 presentation by B cells and the subsequent proliferation of T cells.

271 Furthermore, although we could not stratify our functional analyses by RF status because of the healthy
 272 nature of the blood donors, we found that carriers of the *LRRC55*_{rs717117G} allele showed significantly
 273 decreased levels of IL6 production after stimulation of PBMCs with either *B. burgdorferi* ($P = 0.00046$;

274 Figure 2A) or *E. coli* ($P=0.00044$; Figure 2B), which suggested an implication of the *LRRC55* locus in
275 the modulation of the response to TNFi by regulating IL6 production and likely IL6-mediated T cell
276 differentiation into effector Th2 cells. Functional data from Haploreg also showed that the
277 *LRRC55*_{rs717117} variant correlates with mRNA *P2RX3* expression levels, a well-known gene involved
278 in controlling T cell proliferation. Finally, our functional experiments revealed that carriers of the
279 *MAFB*_{rs6071980} allele showed decreased levels of Chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23; $P=0.0060$;
280 Figure 3A) and increased levels of serum Fibroblast growth factor 19 (FGF-19; $P=0.0034$; Figure 3B).
281 Whereas FGF-19 protein modulates inflammation by mediating IL6 production, CCL23 has been
282 implicated in monocyte recruitment during inflammation and it has been previously shown to
283 positively correlate with drop in DAS28 after treatment with TNFi. Although the effect of the *MAFB*
284 SNP to modulate either serum FGF-19 or CCL23 levels did not remain significant after correction for
285 multiple testing, these results might indicate a weak, but still functional, effect of the *MAFB* locus in
286 modulating response to anti-TNF drugs.

287 4 Discussion

288 Although treatment of RA patients using monoclonal anti-TNF drugs has been a particularly successful
289 approach to control inflammation and to prevent joint destruction and the appearance of bone erosions,
290 non-responsiveness is prevalent and no effective biomarkers for drug response prediction have been
291 consistently identified (Cuppen et al., 2016). This comprehensive validation study aimed at confirming
292 the association of GWAS-identified variants with response to TNFi and to shed some light into the
293 biological mechanisms underlying the most interesting associations. For that purpose, we conducted a
294 two-stage case control study including 2067 RA patients treated with anti-TNF drugs ascertained
295 through the REPAIR consortium but also DANBIO and DREAM registries. The most significant result
296 was the overall association of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP with a poor response to anti-TNF drugs. The
297 meta-analysis of the discovery and replication cohorts showed that each copy of the
298 *LINC02549*_{rs7767069T} allele significantly decreased the improvement in DAS28 by 17% after the
299 treatment with a TNFi. Importantly, the association of the *LINC02549*_{rs7767069} variant with poor
300 response to TNFi was significant in the two populations analyzed and remained significant after
301 correction for multiple testing, which confirmed a role of the *LINC02549* locus in the modulation of
302 response to anti-TNF drugs.

303
304 *LINC02549* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2549) is an RNA gene that is affiliated with
305 the lncRNA class, which represents a large proportion of the human transcriptome. *LINC02549* maps
306 to chromosome 6 and it is expressed in resting T cells and CD4 activated T cells. Although its function
307 is still largely unknown, our data suggest that it might exert a role in determining the number of
308 circulating CD45RO+CD45RA+ T cells, which are a subset of cells frequently found in the synovial
309 fluid of both chronic arthritis (Summers et al., 1994) and RA patients (Koch et al., 1990). According
310 to the results of Koch *et al.* (1990), CD45RA+CD45RO+ T lymphocytes are mostly detected in
311 perivascular regions, which suggest that these lymphocytes might access the RA synovial tissue via
312 the synovial vasculature (Koch et al., 1990) and that, once there, they could play a role in promoting
313 synovial tissue inflammation mainly by the induction of memory immune responses. Therefore, it
314 seems to be plausible to suggest that the negative impact of the *LINC02549*_{rs7767069} SNP on the response
315 to TNFi might be mediated by its role in modulating numbers of CD45RA+CD45RO+ T lymphocytes
316 that could migrate to the synovial tissue and promote inflammatory responses and, thereby hamper the
317 control of inflammation during treatment with anti-TNF drugs. In support of this hypothesis, we found
318 that carriers of two copies of the *LINC02549*_{rs7767069T} allele also showed significantly increased levels
319 of soluble scavenger receptors CD5 and CD6 (sCD5 and sCD6) in serum that are proteins highly
320 expressed in regulatory T cells and a specific subset of B cells (CD5+ or B1a) (Aruffo et al., 1991).

321 Although the origin of these soluble scavenger receptors in RA is poorly understood, it has been
322 suggested that they are shed in the serum by proteases from the surface of activated lymphocytes that
323 subsequently infiltrate synovium structures (Calvo et al., 1999). In fact, increased serum levels of sCD5
324 and sCD6 has been found in subjects diagnosed with RA (Lydyard et al., 1987; Youinou et al.,
325 1988; Jamin et al., 1992; Consuegra-Fernandez et al., 2018b) but also other autoimmune diseases such
326 as primary Sjögren's syndrome (Youinou et al., 1988; Dauphinee et al., 1989; Ramos-Casals et al.,
327 2001), systemic inflammatory response syndrome (Aibar et al., 2015), multiple sclerosis (Consuegra-
328 Fernandez et al., 2018b) or dermatitis (Noh and Lee, 1998). Although the functional role of both soluble
329 scavengers in autoimmune diseases is still under investigation, it is well established that sCD5 and
330 sCD6 are regulators of T cell functions and induce autoreactivity. It is known that they are required for
331 the initiation, differentiation and maintenance of T cell immune responses (Zimmerman et al.,
332 2006; Nair et al., 2010) but also T cell migration and extravasation to the synovial tissue (Alonso-
333 Ramirez et al., 2010). Furthermore, it has been reported that both sCD5 and sCD6 are involved in the
334 modulation of TCR and BCR signaling and determinate T- and B-cell survival (Burgueno-Bucio et al.,
335 2019) and Th17 differentiation (Li et al., 2017; Consuegra-Fernandez et al., 2018a). Furthermore,
336 clinical trials using humanized anti-CD6 mAbs have provided valuable information regarding the
337 potential targeting of CD6 for the treatment of RA but also psoriasis and potentially other T cell-driven
338 autoimmune diseases (Rodriguez et al., 2012; Krupashankar et al., 2014; Rodriguez et al., 2018). Recent
339 investigations have also suggested that genetic alterations within the CD6 gene associated with clinical
340 outcome of several autoimmune diseases (Kofler et al., 2016; Consuegra-Fernandez et al., 2018b) and
341 correlated with the response to TNFi (Krintel et al., 2012a), which pointed to a role of these soluble
342 scavenger receptors in modulating response to anti-TNF drugs. Considering these findings, we
343 hypothesize that, besides its effect on modulating number of the CD45RA+CD45RO+ T lymphocytes,
344 the *LINC02549*_{rs7767069} SNP might negatively influence the response to anti-TNF drugs by stimulating
345 directly or indirectly the production of sCD5 and sCD6 and thereby inducing long-term T cell-mediated
346 immune responses.

347
348 Another interesting result that remained significant after correction for multiple testing was the RF-
349 specific association of the *LRRC55*_{rs717117} SNP with lower changes in DAS28 after the treatment with
350 TNFi. The meta-analysis of the discovery and replication cohorts showed that RF-positive patients
351 carrying the *LRRC55*_{rs717117G} allele have a significantly decreased drop in DAS28 after treatment with
352 a TNFi, whereas an opposite but not statistically significant effect was observed in RF-negative RA
353 patients. Noticeably, functional experiments showed that, after stimulation of PBMCs from healthy
354 subjects with *B. burgdorferi* and *E. coli* bacteria, carriers of the *LRRC55*_{rs717117G} allele showed
355 significantly decreased production of IL6 when compared to those carrying the most common
356 genotype. Although functional experiments could not be stratified by RF because of the healthy nature
357 of blood donors, these results suggested a role of the *LRRC55* locus in modulating IL6-mediated
358 immune responses. On the other hand, functional data from Haploreg also suggested an implication of
359 the *LRRC55*_{rs717117} variant in controlling *P2RX3*-mediated T cell proliferation.

360
361 *LRRC55* gene maps on chromosome 11 and it encodes for the leucine-rich repeat-containing protein
362 55, a protein that belongs to the LRRC superfamily that include hundreds of proteins mainly expressed
363 in brain. Several LRRC proteins have been linked to the regulation of ion channels (Yan and Aldrich,
364 2012) but it has been also demonstrated that LRRC proteins are also implicated in modulating immune
365 responses against bacterial pathogens (Shi et al., 2017) and modulate cell trafficking of membrane
366 receptors such as toll-like receptors (Tatematsu et al., 2015). Although the interplay between *LRRC55*
367 and IL6 has not been demonstrated, our experimental data suggest that the *LRRC55*_{rs717117} SNP
368 modulates IL6 production in response to bacteria and, therefore, might be involved in other IL6-
369 dependent immune processes that could worsen the response to TNFi.

370
371 It is widely known that IL6 can induce both anti-inflammatory and pro-inflammatory immune
372 responses, which depend entirely on the signalling pathway triggered. Whereas anti-inflammatory
373 responses are mostly mediated by the classic signalling cascade (through binding to the transmembrane
374 IL6 receptor), pro-inflammatory responses and chronic inflammation are mediated by trans-signalling
375 (through binding to the soluble IL6 receptor) or by the interaction of IL6R with gp130 (Gabay,
376 2006;Scheller et al., 2011). Considering our functional data, it is conceivable to suggest that the
377 *LRRC55*_{rs717117} SNP might affect the response to TNFi by decreasing IL6 production and thus inhibiting
378 the classical IL6-dependent anti-inflammatory pathway and dysregulating pro-inflammatory
379 responses. In support of this hypothesis, several mouse models have shown that the activation of the
380 IL6 classic signaling pathway is essential for the activation of STAT3-mediated signaling pathways
381 which reduce inflammation and induce the regeneration of the affected tissues (Becker et al., 2004). In
382 addition, it has been reported that IL6 is one of the earliest factors that trigger the differentiation of
383 naive T cells into effector Th2 cells in vitro and that, when absent, aggravates the development of the
384 inflammatory processes (Scheller et al., 2011).

385
386 Finally, although the genetic association of the *MAFB*_{rs6071980} SNP with lower response to TNFi did not
387 remain significant after correction for multiple testing, we found that the *MAFB*_{rs6071980} SNP correlated
388 with higher levels of serum FGF-19 and decreased levels of CCL23. Given that FGF-19 is a master
389 protein involved in the inhibition of intestinal inflammation (Gadaleta et al., 2020a;b) and CCL23 has
390 been positively correlated with the DAS28 score in RA patients (Rioja et al., 2008), we think that it
391 would worth to investigate more in detail the impact of this SNP on drug response in future studies. In
392 addition, it might be interesting to further analyze the weak association of the *CNTN5*_{rs1813443} SNP with
393 poor response to TNFi. However, given that we could not find any significant impact of this marker on
394 immune responses, blood cell counts or serum inflammatory proteins or steroid hormones, we are prone
395 to think that this SNP might not have a relevant role in modulating response to TNFi.

396
397 This study has both strengths and weaknesses. Among the strengths we can highlight the use of large
398 and well-characterized RA patient populations that allowed the development of a well-powered overall
399 association analysis but also to investigate the effect modification by RF status. Overall, we had 80%
400 of power to detect an OR of 1.18 ($\alpha=0.00089$) for a SNP with a frequency of 0.25. On the other hand,
401 it is worth mentioning the comprehensive analysis of the functional effect of the most interesting
402 genetic variants on modulating immune responses, which was performed using a large sample size for
403 this kind of studies. We analysed cQTL and hQTL data but also counts of 91 blood-derived cell
404 populations and serum levels of 103 immunological proteins. An important limitation of this study was
405 the impossibility to control our functional experiments by RF due to the healthy nature of the subjects
406 included in the HFGP cohort.

407
408 In conclusion, this study validates the overall or RF-specific association of *LINC02549* and *LRRC55*
409 loci with the response to TNFi and provides new insights into the functional role of these
410 polymorphisms in modulating immune responses and response to anti-TNF drugs.

411 **5 Conflict of Interest**

412 The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation
413 of the manuscript. VA has received compensation for consultancy and for being a member of an
414 advisory board from MSD (Merck) and Janssen. BG received funding for research from AbbVie,
415 Biogen, and Pfizer. MLH received funding for research from Abbvie, Biogen, BMS, CellTrion, MSD,
416 Novartis, Orion, Pfizer, Samsung and UCB. JEF received unrestricted research grants or acted as a

417 speaker for Abbvie, Ache, Amgen, Biogen, BMS, Janssen, Lilly, MSD, Novartis, Pfizer, Roche, UCB.
418 AdB has received congress invitations, personal fees and research fees (to the department) from
419 Boehringer, Amgen, Abbvie, Biogen, Cellgene, Pfizer, Novartis, Galapagos, Gilead, Roche, Sanofi.
420 The rest of authors declare that they have no competing interests.

421 **6 Author Contributions**

422 R. Caliz and J. Sainz designed the study and drafted the manuscript. J. Sanchez-Maldonado, A. Moñiz-
423 Díez, and AJ. Cabrera-Serrano were responsible for genotyping. MA. López-Nevot, H. Canhão, L.
424 Quartuccio, SB. Sorensen, B. Glintborg, ML. Hetland, I. Filipescu, E. Pérez-Pampin, P. Conesa-
425 Zamora, J. Swierkot, A. den Broeder, S. de Vita, EBR Petersen, MA. Ferrer, A. Escudero, MJH.
426 Coenen, V. Andersen, JE. Fonseca, M. Jurado, K. Bogunia-Kubik, E. Collantes, and J. Sainz
427 coordinated the sample collection and H. Canhão, I. Filipescu, and MA. Ferrer were involved in the
428 records review and data acquisition. JM. Sánchez-Maldonado and J. Sainz performed data quality
429 control of genetic data and statistical analysis. M. Netea, R Ter Horst, Y Li provided the functional
430 raw data and J. Sainz performed the analysis of functional data. All authors contributed to and approved
431 the final version of the manuscript.

432 **7 Funding**

433 This study was supported by grants PI17/02276 and PI20/01845 from Fondo de Investigaciones
434 Sanitarias (Madrid, Spain) and by intramural funds of GENYO and FIBAO foundation (Granada,
435 Spain). This study was also supported by the Novo Nordisk Fonden (NNF15OC0016932, VA) and
436 Knud og Edith Eriksens Mindefond (VA) and Gigtforeningen (A2037, A3570, VA). JS and KBK were
437 supported by the grant No. 2016/21/B/NZ5/01901 from the National Science Centre (Poland). MGN
438 was supported by a Spinoza grant from the Netherlands Organization for Scientific Research. YL was
439 supported by an ERC Starting Grant (948207) and the Radboud University Medical Centre Hypatia
440 Grant (2018) for Scientific Research.

441 **8 Acknowledgments**

442 We thank all participants who have agreed to participate in this study. Authors also thank María
443 Dolores Casares, Ángeles Molina, Carmen Oloriz for the collection of Spanish samples and Hans
444 Jurgen Hoffmann, Marianne Thomsen, Vibeke Østergaard Thomsen, Malene Rohr Andersen, Lise
445 Lotte B. Laursen, Helle Jørgensen, Ram Benny Christian Dessau, Niels Steen Krogh, Ulla Vogel, Paal
446 Skytt Andersen, Ivan Brandslund, Steffen Bank, Frederik Trier Møller, Nikolai Toft and Niels Møller
447 Andersen for the participation in collection and purification of Danish samples. We also thank the
448 Danish Departments of Rheumatology for their implication in the collection of clinical data from RA
449 patients included in the DANBIO cohort and the Danish Rheumatologic Biobank. Likewise, we would
450 like to thank Teun van Herwaarden for steroid hormone measurements in serum samples from subjects
451 ascertained through the HFGP initiative.

452 **9 Reference styles**

453 Aibar, J., Martinez-Florensa, M., Castro, P., Carrasco, E., Escoda-Ferran, C., Fernandez, S., Butjosa,
454 M., Hernandez, C., Rinaudo, M., Lozano, F., and Nicolas, J.M. (2015). Pattern of soluble CD5
455 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes. *J Crit Care* 30,
456 914-919.

- 457 Alonso-Ramirez, R., Loisel, S., Buors, C., Pers, J.O., Montero, E., Youinou, P., and Renaudineau, Y.
458 (2010). Rationale for Targeting CD6 as a Treatment for Autoimmune Diseases. *Arthritis* 2010,
459 130646.
- 460 Aruffo, A., Melnick, M.B., Linsley, P.S., and Seed, B. (1991). The lymphocyte glycoprotein CD6
461 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted
462 proteins. *J Exp Med* 174, 949-952.
- 463 Atzeni, F., Benucci, M., Salli, S., Bongiovanni, S., Boccassini, L., and Sarzi-Puttini, P. (2013).
464 Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 12, 575-579.
- 465 Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S.,
466 Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R.,
467 Blessing, M., Rose-John, S., and Neurath, M.F. (2004). TGF-beta suppresses tumor progression
468 in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491-501.
- 469 Burgueno-Bucio, E., Mier-Aguilar, C.A., and Soldevila, G. (2019). The multiple faces of CD5. *J*
470 *Leukoc Biol* 105, 891-904.
- 471 Calvo, J., Places, L., Espinosa, G., Padilla, O., Vila, J.M., Villamor, N., Ingelmo, M., Gallart, T., Vives,
472 J., Font, J., and Lozano, F. (1999). Identification of a natural soluble form of human CD5.
473 *Tissue Antigens* 54, 128-137.
- 474 Canet, L.M., Caliz, R., Lupianez, C.B., Canhao, H., Martinez, M., Escudero, A., Filipescu, I., Segura-
475 Catena, J., Soto-Pino, M.J., Ferrer, M.A., Garcia, A., Romani, L., Perez-Pampin, E., Gonzalez-
476 Utrilla, A., Lopez Nevot, M.A., Collantes, E., Fonseca, J.E., and Sainz, J. (2015a). Genetic
477 variants within immune-modulating genes influence the risk of developing rheumatoid arthritis
478 and anti-TNF drug response: a two-stage case-control study. *Pharmacogenet Genomics* 25,
479 432-443.
- 480 Canet, L.M., Filipescu, I., Caliz, R., Lupianez, C.B., Canhao, H., Escudero, A., Segura-Catena, J., Soto-
481 Pino, M.J., Ferrer, M.A., Garcia, A., Romani, L., Perez-Pampin, E., Gonzalez-Utrilla, A.,
482 Lopez Nevot, M.A., Collantes, E., Fonseca, J.E., and Sainz, J. (2015b). Genetic variants within
483 the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs:
484 a multicenter study. *Pharmacogenet Genomics* 25, 323-333.
- 485 Canet, L.M., Sanchez-Maldonado, J.M., Caliz, R., Rodriguez-Ramos, A., Lupianez, C.B., Canhao, H.,
486 Martinez-Bueno, M., Escudero, A., Segura-Catena, J., Sorensen, S.B., Hetland, M.L., Soto-
487 Pino, M.J., Ferrer, M.A., Garcia, A., Glinborg, B., Filipescu, I., Perez-Pampin, E., Gonzalez-
488 Utrilla, A., Nevot, M.a.L., Conesa-Zamora, P., Broeder, A.D., De Vita, S., Jacobsen, S.E.H.,
489 Collantes-Estevez, E., Quartuccio, L., Canzian, F., Fonseca, J.E., Coenen, M.J.H., Andersen,
490 V., and Sainz, J. (2019). Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor
491 loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients.
492 *Pharmacogenomics J* 19, 83-96.
- 493 Canhao, H., Rodrigues, A.M., Santos, M.J., Carmona-Fernandes, D., Bettencourt, B.F., Cui, J., Rocha,
494 F.L., Canas Silva, J., Polido-Pereira, J., Pereira Silva, J.A., Costa, J.A., Araujo, D., Silva, C.,
495 Santos, H., Duarte, C., Caliz, R., Filipescu, I., Pimentel-Santos, F., Branco, J., Sainz, J., Plenge,
496 R.M., Solomon, D.H., Bruges-Armas, J., Da Silva, J.A., Fonseca, J.E., and Karlson, E.W.
497 (2015). TRAF1/C5 but not PTPRC variants are potential predictors of rheumatoid arthritis
498 response to anti-tumor necrosis factor therapy. *Biomed Res Int* 2015, 490295.
- 499 Consuegra-Fernandez, M., Julia, M., Martinez-Florensa, M., Aranda, F., Catala, C., Armiger-Borras,
500 N., Arias, M.T., Santiago, F., Guilabert, A., Esteve, A., Munoz, C., Ferrandiz, C., Carrascosa,
501 J.M., Pedrosa, E., Romani, J., Alsina, M., Mascaro-Galy, J.M., and Lozano, F. (2018a). Genetic
502 and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in psoriasis.
503 *Cell Mol Immunol* 15, 898-906.
- 504 Consuegra-Fernandez, M., Lin, F., Fox, D.A., and Lozano, F. (2018b). Clinical and experimental
505 evidence for targeting CD6 in immune-based disorders. *Autoimmun Rev* 17, 493-503.

- 506 Cui, J., Stahl, E.A., Saevarsdottir, S., Miceli, C., Diogo, D., Trynka, G., Raj, T., Mirkov, M.U., Canhao,
507 H., Ikari, K., Terao, C., Okada, Y., Wedren, S., Askling, J., Yamanaka, H., Momohara, S.,
508 Taniguchi, A., Ohmura, K., Matsuda, F., Mimori, T., Gupta, N., Kuchroo, M., Morgan, A.W.,
509 Isaacs, J.D., Wilson, A.G., Hyrich, K.L., Herenius, M., Doorenspleet, M.E., Tak, P.P., Crusius,
510 J.B., Van Der Horst-Bruinsma, I.E., Wolbink, G.J., Van Riel, P.L., Van De Laar, M.,
511 Guchelaar, H.J., Shadick, N.A., Allaart, C.F., Huizinga, T.W., Toes, R.E., Kimberly, R.P.,
512 Bridges, S.L., Jr., Criswell, L.A., Moreland, L.W., Fonseca, J.E., De Vries, N., Stranger, B.E.,
513 De Jager, P.L., Raychaudhuri, S., Weinblatt, M.E., Gregersen, P.K., Mariette, X., Barton, A.,
514 Padyukov, L., Coenen, M.J., Karlson, E.W., and Plenge, R.M. (2013). Genome-wide
515 association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to
516 etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet* 9, e1003394.
- 517 Cuppen, B.V., Welsing, P.M., Sprengers, J.J., Bijlsma, J.W., Marijnissen, A.C., Van Laar, J.M.,
518 Lafeber, F.P., and Nair, S.C. (2016). Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis:
519 a systematic review with a focus on clinical applicability. *Rheumatology (Oxford)* 55, 826-839.
- 520 Dauphinee, M.J., Tovar, Z., Ballester, A., and Talal, N. (1989). The expression and function of CD3
521 and CD5 in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 32, 420-429.
- 522 Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8 Suppl 2, S3.
- 523 Gadaleta, R.M., Garcia-Irigoyen, O., Cariello, M., Scialpi, N., Peres, C., Vetrano, S., Fiorino, G.,
524 Danese, S., Ko, B., Luo, J., Porru, E., Roda, A., Sabba, C., and Moschetta, A. (2020a).
525 Corrigendum to 'Fibroblast growth factor 19 modulates intestinal microbiota and inflammation
526 in presence of farnesoid x receptor': [EBioMedicine 54 (2020) 102719]. *EBioMedicine* 57,
527 102873.
- 528 Gadaleta, R.M., Garcia-Irigoyen, O., Cariello, M., Scialpi, N., Peres, C., Vetrano, S., Fiorino, G.,
529 Danese, S., Ko, B., Luo, J., Porru, E., Roda, A., Sabba, C., and Moschetta, A. (2020b).
530 Fibroblast Growth Factor 19 modulates intestinal microbiota and inflammation in presence of
531 Farnesoid X Receptor. *EBioMedicine* 54, 102719.
- 532 Honne, K., Hallgrimsdottir, I., Wu, C., Sebros, R., Jewell, N.P., Sakurai, T., Iwamoto, M., Minota, S.,
533 and Jawaheer, D. (2016). A longitudinal genome-wide association study of anti-tumor necrosis
534 factor response among Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 18, 12.
- 535 Ibfelt, E.H., Jensen, D.V., and Hetland, M.L. (2016). The Danish nationwide clinical register for
536 patients with rheumatoid arthritis: DANBIO. *Clin Epidemiol* 8, 737-742.
- 537 Ibfelt, E.H., Sorensen, J., Jensen, D.V., Dreyer, L., Schiottz-Christensen, B., Thygesen, P.H., Colic,
538 A., Raun, J.L., Manilo, N., Rodgaard, A., Poulsen, U.E., Rasmussen, C., Hansen, T., Unger,
539 B., Pelck, R., Kincses, A., Nordin, H., Lorenzen, T., Theibich, A., Jensen Hansen, I.M.,
540 Espesen, J., Grydehoj, J., Holland-Fischer, M., Loft, A.G., and Hetland, M.L. (2017). Validity
541 and completeness of rheumatoid arthritis diagnoses in the nationwide DANBIO clinical register
542 and the Danish National Patient Registry. *Clin Epidemiol* 9, 627-632.
- 543 Jamin, C., Magadur, G., Lamour, A., Mackenzie, L., Lydyard, P., Katsikis, P., and Youinou, P. (1992).
544 Cell-free CD5 in patients with rheumatic diseases. *Immunol Lett* 31, 79-83.
- 545 Julia, A., Fernandez-Nebro, A., Blanco, F., Ortiz, A., Canete, J.D., Maymo, J., Alperi-Lopez, M.,
546 Fernandez-Gutierrez, B., Olive, A., Corominas, H., Erra, A., Acosta-Colman, I., Alonso, A.,
547 Lopez-Lasanta, M., Tortosa, R., Tornero, J., and Marsal, S. (2016). A genome-wide association
548 study identifies a new locus associated with the response to anti-TNF therapy in rheumatoid
549 arthritis. *Pharmacogenomics J* 16, 147-150.
- 550 Keystone, E.C., Kavanaugh, A.F., Sharp, J.T., Tannenbaum, H., Hua, Y., Teoh, L.S., Fischkoff, S.A.,
551 and Chartash, E.K. (2004). Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with
552 adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active
553 rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-
554 controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 50, 1400-1411.

- 555 Koch, A.E., Robinson, P.G., Radosevich, J.A., and Pope, R.M. (1990). Distribution of CD45RA and
556 CD45RO T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Clin Immunol* 10,
557 192-199.
- 558 Kofler, D.M., Farkas, A., Von Bergwelt-Baildon, M., and Hafler, D.A. (2016). The Link Between CD6
559 and Autoimmunity: Genetic and Cellular Associations. *Curr Drug Targets* 17, 651-665.
- 560 Krintel, S.B., Essioux, L., Wool, A., Johansen, J.S., Schreiber, E., Zekharya, T., Akiva, P., Ostergaard,
561 M., and Hetland, M.L. (2012a). CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to
562 tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*
563 7, e38539.
- 564 Krintel, S.B., Palermo, G., Johansen, J.S., Germer, S., Essioux, L., Benayed, R., Badi, L., Ostergaard,
565 M., and Hetland, M.L. (2012b). Investigation of single nucleotide polymorphisms and
566 biological pathways associated with response to TNFalpha inhibitors in patients with
567 rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics* 22, 577-589.
- 568 Krupashankar, D.S., Dogra, S., Kura, M., Saraswat, A., Budamakuntla, L., Sumathy, T.K., Shah, R.,
569 Gopal, M.G., Narayana Rao, T., Srinivas, C.R., Bhat, R., Shetty, N., Manmohan, G., Sai
570 Krishna, K., Padmaja, D., Pratap, D.V., Garg, V., Gupta, S., Pandey, N., Khopkar, U., Montero,
571 E., Ramakrishnan, M.S., Nair, P., and Ganapathi, P.C. (2014). Efficacy and safety of
572 itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic
573 plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III study. *J*
574 *Am Acad Dermatol* 71, 484-492.
- 575 Li, Y., Singer, N.G., Whitbred, J., Bowen, M.A., Fox, D.A., and Lin, F. (2017). CD6 as a potential
576 target for treating multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 2687-2692.
- 577 Liu, C., Batliwalla, F., Li, W., Lee, A., Roubenoff, R., Beckman, E., Khalili, H., Damle, A., Kern, M.,
578 Furie, R., Dupuis, J., Plenge, R.M., Coenen, M.J., Behrens, T.W., Carulli, J.P., and Gregersen,
579 P.K. (2008). Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated
580 with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 14, 575-581.
- 581 Lydyard, P.M., Youinou, P.Y., and Cooke, A. (1987). CD5-positive B cells in rheumatoid arthritis and
582 chronic lymphocytic leukemia. *Immunol Today* 8, 37-39.
- 583 Manuel Sanchez-Maldonado, J., Martinez-Bueno, M., Canhao, H., Ter Horst, R., Munoz-Pena, S.,
584 Moniz-Diez, A., Rodriguez-Ramos, A., Escudero, A., Sorensen, S.B., Hetland, M.L., Ferrer,
585 M.A., Glintborg, B., Filipescu, I., Perez-Pampin, E., Conesa-Zamora, P., Garcia, A., Den
586 Broeder, A., De Vita, S., Hove Jacobsen, S.E., Collantes, E., Quartuccio, L., Netea, M.G., Li,
587 Y., Fonseca, J.E., Jurado, M., Lopez-Nevot, M.A., Coenen, M.J.H., Andersen, V., Caliz, R.,
588 and Sainz, J. (2020). NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid
589 arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium. *Sci Rep* 10,
590 4316.
- 591 Nair, P., Melarkode, R., Rajkumar, D., and Montero, E. (2010). CD6 synergistic co-stimulation
592 promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated
593 leucocyte cell adhesion molecule interaction. *Clin Exp Immunol* 162, 116-130.
- 594 Noh, G.W., and Lee, K.Y. (1998). Circulating soluble CD5 in atopic dermatitis. *Mol Cells* 8, 618-622.
- 595 Pisetsky, D.S., and Ward, M.M. (2012). Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract*
596 *Res Clin Rheumatol* 26, 251-261.
- 597 Plant, D., Bowes, J., Potter, C., Hyrich, K.L., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Isaacs, J.D., Wellcome
598 Trust Case Control, C., British Society for Rheumatology Biologics, R., and Barton, A. (2011).
599 Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment
600 efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci.
601 *Arthritis Rheum* 63, 645-653.
- 602 Plenge, R.M., and Bridges, S.L., Jr. (2011). Personalized medicine in rheumatoid arthritis: miles to go
603 before we sleep. *Arthritis Rheum* 63, 590-593.

- 604 Potter, C., Cordell, H.J., Barton, A., Daly, A.K., Hyrich, K.L., Mann, D.A., Morgan, A.W., Wilson,
605 A.G., Biologics in Rheumatoid Arthritis, G., Genomics Study, S., and Isaacs, J.D. (2010).
606 Association between anti-tumour necrosis factor treatment response and genetic variants within
607 the TLR and NF{ κ }B signalling pathways. *Ann Rheum Dis* 69, 1315-1320.
- 608 Ramos-Casals, M., Font, J., Garcia-Carrasco, M., Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Cervera, R., Bowen,
609 M.A., Lozano, F., and Ingelmo, M. (2001). High circulating levels of soluble scavenger
610 receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology*
611 (*Oxford*) 40, 1056-1059.
- 612 Rioja, I., Hughes, F.J., Sharp, C.H., Warnock, L.C., Montgomery, D.S., Akil, M., Wilson, A.G., Binks,
613 M.H., and Dickson, M.C. (2008). Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid
614 arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor
615 receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis Rheum*
616 58, 2257-2267.
- 617 Rodriguez, P.C., Prada, D.M., Moreno, E., Aira, L.E., Molinero, C., Lopez, A.M., Gomez, J.A.,
618 Hernandez, I.M., Martinez, J.P., Reyes, Y., Milera, J.M., Hernandez, M.V., Torres, R., Avila,
619 Y., Barrese, Y., Viada, C., Montero, E., and Hernandez, P. (2018). The anti-CD6 antibody
620 itolizumab provides clinical benefit without lymphopenia in rheumatoid arthritis patients:
621 results from a 6-month, open-label Phase I clinical trial. *Clin Exp Immunol* 191, 229-239.
- 622 Rodriguez, P.C., Torres-Moya, R., Reyes, G., Molinero, C., Prada, D., Lopez, A.M., Hernandez, I.M.,
623 Hernandez, M.V., Martinez, J.P., Hernandez, X., Casaco, A., Ramos, M., Avila, Y., Barrese,
624 Y., Montero, E., and Hernandez, P. (2012). A clinical exploratory study with itolizumab, an
625 anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis. *Results Immunol* 2, 204-
626 211.
- 627 Safiri, S., Kolahi, A.A., Hoy, D., Smith, E., Bettampadi, D., Mansournia, M.A., Almasi-Hashiani, A.,
628 Ashrafi-Asgarabad, A., Moradi-Lakeh, M., Qorbani, M., Collins, G., Woolf, A.D., March, L.,
629 and Cross, M. (2019). Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017:
630 a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis* 78, 1463-
631 1471.
- 632 Sanchez-Maldonado, J.M., Caliz, R., Canet, L., Horst, R.T., Bakker, O., Den Broeder, A.A., Martinez-
633 Bueno, M., Canhao, H., Rodriguez-Ramos, A., Lupianez, C.B., Soto-Pino, M.J., Garcia, A.,
634 Perez-Pampin, E., Gonzalez-Utrilla, A., Escudero, A., Segura-Catena, J., Netea-Maier, R.T.,
635 Ferrer, M.A., Collantes-Estevez, E., Lopez Nevot, M.A., Li, Y., Jurado, M., Fonseca, J.E.,
636 Netea, M.G., Coenen, M.J.H., and Sainz, J. (2019). Steroid hormone-related polymorphisms
637 associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict
638 disease progression: Results from the REPAIR consortium. *Sci Rep* 9, 14812.
- 639 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory
640 properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813, 878-888.
- 641 Scott, D.L., Wolfe, F., and Huizinga, T.W. (2010). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-1108.
- 642 Shi, X.Z., Feng, X.W., Sun, J.J., Zhao, X.F., and Wang, J.X. (2017). Leucine-rich repeats containing
643 protein functions in the antibacterial immune reaction in stomach of kuruma shrimp
644 *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 61, 130-137.
- 645 Sode, J., Vogel, U., Bank, S., Andersen, P.S., Hetland, M.L., Loch, H., Heegaard, N.H., and Andersen,
646 V. (2015). Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated with Anti-
647 TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 10, e0139781.
- 648 Sode, J., Vogel, U., Bank, S., Andersen, P.S., Hetland, M.L., Loch, H., Heegaard, N.H.H., and
649 Andersen, V. (2018). Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker predicting
650 response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* 18, 81-86.

- 651 Suarez-Gestal, M., Perez-Pampin, E., Calaza, M., Gomez-Reino, J.J., and Gonzalez, A. (2010). Lack
652 of replication of genetic predictors for the rheumatoid arthritis response to anti-TNF treatments:
653 a prospective case-only study. *Arthritis Res Ther* 12, R72.
- 654 Summers, K.L., O'donnell, J.L., and Hart, D.N. (1994). Co-expression of the CD45RA and CD45RO
655 antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clin Exp Immunol* 97, 39-44.
- 656 Swertz, M.A., Dijkstra, M., Adamusiak, T., Van Der Velde, J.K., Kanterakis, A., Roos, E.T., Lops, J.,
657 Thorisson, G.A., Arends, D., Byelas, G., Muilu, J., Brookes, A.J., De Brock, E.O., Jansen, R.C.,
658 and Parkinson, H. (2010). The MOLGENIS toolkit: rapid prototyping of biosoftware at the
659 push of a button. *BMC Bioinformatics* 11 Suppl 12, S12.
- 660 Tatematsu, M., Funami, K., Ishii, N., Seya, T., Obuse, C., and Matsumoto, M. (2015). LRRC59
661 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via
662 Association with UNC93B1. *J Immunol* 195, 4933-4942.
- 663 Tesar, T., Golias, P., Kobliskova, Z., Wawruch, M., Kawalec, P., and Inotai, A. (2020). Potential Cost-
664 Savings From the Use of the Biosimilars in Slovakia. *Front Public Health* 8, 431.
- 665 Umicevic Mirkov, M., Cui, J., Vermeulen, S.H., Stahl, E.A., Toonen, E.J., Makkinje, R.R., Lee, A.T.,
666 Huizinga, T.W., Allaart, R., Barton, A., Mariette, X., Miceli, C.R., Criswell, L.A., Tak, P.P.,
667 De Vries, N., Saevarsdottir, S., Padyukov, L., Bridges, S.L., Van Schaardenburg, D.J., Jansen,
668 T.L., Dutmer, E.A., Van De Laar, M.A., Barrera, P., Radstake, T.R., Van Riel, P.L., Scheffer,
669 H., Franke, B., Brunner, H.G., Plenge, R.M., Gregersen, P.K., Guchelaar, H.J., and Coenen,
670 M.J. (2013). Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with
671 rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 72, 1375-1381.
- 672 Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson,
673 C.G., Lange, M., and Burge, D.J. (1999). A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis
674 factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate.
675 *N Engl J Med* 340, 253-259.
- 676 Wilkinson, M.D., Dumontier, M., Aalbersberg, I.J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N.,
677 Boiten, J.W., Da Silva Santos, L.B., Bourne, P.E., Bouwman, J., Brookes, A.J., Clark, T.,
678 Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C.T., Finkers, R., Gonzalez-Beltran, A.,
679 Gray, A.J., Groth, P., Goble, C., Grethe, J.S., Heringa, J., T Hoen, P.A., Hooft, R., Kuhn, T.,
680 Kok, R., Kok, J., Lusher, S.J., Martone, M.E., Mons, A., Packer, A.L., Persson, B., Rocca-
681 Serra, P., Roos, M., Van Schaik, R., Sansone, S.A., Schultes, E., Sengstag, T., Slater, T.,
682 Strawn, G., Swertz, M.A., Thompson, M., Van Der Lei, J., Van Mulligen, E., Velterop, J.,
683 Waagmeester, A., Wittenburg, P., Wolstencroft, K., Zhao, J., and Mons, B. (2016). The FAIR
684 Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data* 3, 160018.
- 685 Wilkinson, M.D., Dumontier, M., Jan Aalbersberg, I., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg,
686 N., Boiten, J.W., Da Silva Santos, L.B., Bourne, P.E., Bouwman, J., Brookes, A.J., Clark, T.,
687 Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C.T., Finkers, R., Gonzalez-Beltran, A.,
688 Gray, A.J.G., Groth, P., Goble, C., Grethe, J.S., Heringa, J., Hoen, P.a.C., Hooft, R., Kuhn, T.,
689 Kok, R., Kok, J., Lusher, S.J., Martone, M.E., Mons, A., Packer, A.L., Persson, B., Rocca-
690 Serra, P., Roos, M., Van Schaik, R., Sansone, S.A., Schultes, E., Sengstag, T., Slater, T.,
691 Strawn, G., Swertz, M.A., Thompson, M., Van Der Lei, J., Van Mulligen, E., Jan, V.,
692 Waagmeester, A., Wittenburg, P., Wolstencroft, K., Zhao, J., and Mons, B. (2019). Addendum:
693 The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci Data* 6, 6.
- 694 Yan, J., and Aldrich, R.W. (2012). BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing
695 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7917-7922.
- 696 Youinou, P., Mackenzie, L., Broker, B.M., Isenberg, D.I., Drogou-Lelong, A., Gentric, A., and
697 Lydyard, P.M. (1988). The importance of CD5-positive B cells in nonorgan-specific
698 autoimmune diseases. *Scand J Rheumatol Suppl* 76, 243-249.

699 Zimmerman, A.W., Joosten, B., Torensma, R., Parnes, J.R., Van Leeuwen, F.N., and Figdor, C.G.
700 (2006). Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation
701 induced by dendritic cells. *Blood* 107, 3212-3220.

702

703 **10 Data Availability Statement**

704 All data used in this project have been meticulously catalogued and archived in the BBMRI-NL data
705 infrastructure (<https://hfgp.bbmri.nl/>) using the MOLGENIS open-source platform for scientific data
706 (Swertz et al., 2010). This allows flexible data querying and download, including sufficiently rich
707 metadata and interfaces for machine processing (R statistics, REST API) and using FAIR principles to
708 optimize Findability, Accessibility, Interoperability and Reusability (Wilkinson et al., 2016; Wilkinson
709 et al., 2019). Genetic data from the discovery and DANBIO populations can be accessed at ftp.genyo.es
710 and data from the DREAM registry are available at
711 <https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn3280809/wiki/194735> and
712 <https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn3280809/wiki/194736>.

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732 **Table 1.** Demographic and clinical characteristics of anti-TNF patients.

| Anti-TNF patients (n=1361) | |
|---|--|
| <i>Demographic characteristics</i> | <i>REPAIR consortium + DANBIO registry</i> |
| <i>Age (years)</i> | 52 ± 14 |
| <i>Sex ratio (female/male)</i> | 3.4 (1050/310) |
| <i>Clinical assessment</i> | |
| <i>Percentage of patients with RF positivity</i> [†] | 721 (67.45) |
| <i>Percentage of ACPA-positive patients</i> [‡] | 728 (64.03) |
| <i>DAS28 at baseline</i> | 5.91 ± 1.23 |
| <i>Disease duration (years)</i> | 12.92 ± 12.90 |
| <i>Treatments</i> | |
| <i>First biologic agent</i> | |
| <i>Infliximab (%)</i> | 386 (28.36) |
| <i>Etanercept (%)</i> | 466 (34.24) |
| <i>Adalimumab (%)</i> | 413 (30.35) |
| <i>Golimumab (%)</i> | 48 (03.53) |
| <i>Certolizumab (%)</i> | 67 (04.04) |
| <i>Biosimilars (%)</i> | 16 (01.76) |

733

734 Number of patients (%)

735 [†] RF status was available for 1069 patients.736 [‡] ACPA status was available for 1137 patients.

737

738

739

740

741

742

743

744

Table 2. Selection of GWAS-identified SNPs for response to anti-TNF drugs.

| dbSNP rs# | Chr. | Position (GRCh38.p7) | Nearest gene | Nucleotide substitution | Effect allele |
|------------|------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------|
| rs885813 | 1 | 21550581 | ALPL | C/T | T |
| rs885814 | 1 | 21549423 | ALPL | C/T | T |
| rs1813443 | 11 | 100140279 | CNTN5 | G/C | C |
| rs8046065 | 16 | 3788297 | CREBBP | C/T | T |
| rs6138150 | 20 | 23866372 | CST2 CST5 | C/T | C |
| rs6028945 | 20 | 40192165 | HSPEP1 MAFB | G/T | T |
| rs6071980 | 20 | 40239936 | HSPEP1 MAFB | C/T | C |
| rs3849942 | 9 | 27543283 | IFNK C9orf72 | T/C | T |
| rs13393173 | 2 | 168532581 | LASS6 | A/G | A |
| rs4411591 | 18 | 6550118 | LINC01387 | C/T | A |
| rs983332 | 1 | 87666697 | LMO4 PKN2 | A/C | A |
| rs1875620 | 9 | 88925144 | C9orf47 LOC100128660 LOC100128911 | A/G | A |
| rs1539909 | 18 | 71581359 | CBLN2 LOC100132647 | A/G | A |
| rs7767069 | 6 | 68060671 | LOC102723883 LINC02549 | A/T | T |
| rs1568885 | 7 | 13597906 | LOC107986770 ETV1 | A/T | T |
| rs10520789 | 15 | 95598638 | LINC00924 | A/G | A |
| rs11870477 | 17 | 69806211 | MAP2K6 KCNJ16 | A/C | C |
| rs2378945 | 14 | 31831584 | NUBPL | G/A | A |
| rs717117 | 11 | 57127131 | OR5BP1P LRRC55 | A/G | G |
| rs1532269 | 5 | 32018735 | PDZD2 | C/G | G |
| rs4651370 | 1 | 187269960 | PLA2G4A FDPSL1 | A/T | A |
| rs854547 | 7 | 95294544 | PPP1R9A | A/G | G |
| rs854548 | 7 | 95296508 | PPP1R9A PON1 | A/G | A |
| rs10945919 | 6 | 163765645 | QKI LOC728275 | A/G | G |
| rs437943 | 4 | 35370476 | CENTD1 | A/G | G |
| rs3794271 | 12 | 20707159 | SLCO1C1 | C/T | C |
| rs4694890 | 4 | 48224250 | TEC | A/C | C |
| rs1447722 | 3 | 139835611 | TRMT112P5 | C/G | C |

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

References: 1. Krintel SB et al. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Aug;22(8):577-89. PMID 22569225; 2. Umicevic Mirkov M, et al. 81. PMID 23233654; 3. Liu C, et al. *Mol Med*. 2008 Sep-Oct;14(9-10):575-81. PMID 18615156; 4. Plant D, et al. *Arthritis Rheum*. 2010;52(10):3013-3021. doi:10.1002/art.30130. Cited in: Pubmed; PMID 21061259.

753 **Table 3.** Overall and RF-specific associations of selected polymorphisms and response to anti-TNF drugs (Δ DA

| Gene | SNP ID | Effect allele | Overall REPAIR+DANBIO (n=1361) | | RF-positive patients REPAIR+DANBIO (n=721) | | C |
|-------------------------|------------|---------------|-------------------------------------|--------------|--|----------------|-----|
| | | | OR (95% CI) [§] | P | OR (95% CI) [§] | P | |
| ALPL | rs885813 | T | 0.96 (0.86-1.07) | 0.48 | 1.06 (0.91-1.22) | 0.47 | 0.0 |
| ALPL | rs885814 | T | 0.96 (0.85-1.07) | 0.45 | 0.91 (0.78-1.06) | 0.24 | 1.0 |
| CNTN5 | rs1813443 | C | 0.97 (0.84-1.13) [†] | 0.72 | 0.79 (0.65-0.97)[†] | 0.023 | 1.0 |
| CREBBP | rs8046065 | T | 1.01 (0.87-1.19) | 0.85 | 1.18 (0.96-1.45) | 0.11 | 0.0 |
| CST2 CST5 | rs6138150 | C | 1.06 (0.92-1.22) | 0.40 | 1.04 (0.87-1.26) | 0.66 | 1.0 |
| HSPEP1 MAFB | rs6028945 | T | 0.81 (0.68-0.97)[†] | 0.020 | 0.89 (0.70-1.21) [†] | 0.31 | 0.0 |
| HSPEP1 MAFB | rs6071980 | C | 0.83 (0.72-0.97) | 0.020 | 0.85 (0.70-1.03) | 0.10 | 0.0 |
| IFNK C9orf72 | rs3849942 | T | 1.02 (0.90-1.15) | 0.74 | 0.93 (0.79-1.10) | 0.39 | 1.0 |
| LASS6 | rs13393173 | A | 1.10 (0.96-1.25) | 0.19 | 1.08 (0.91-1.28) | 0.41 | 1.0 |
| LMO4 PKN2 | rs983332 | A | 1.12 (0.97-1.29) | 0.11 | 1.14 (0.95-1.38) | 0.16 | 1.0 |
| C9orf47 | rs1875620 | A | 0.94 (0.84-1.04) | 0.24 | 0.93 (0.81-1.08) | 0.34 | 0.0 |
| CBLN2 LOC100132647 | rs1539909 | A | 0.96 (0.81-1.13) | 0.62 | 0.88 (0.70-1.10) | 0.27 | 0.0 |
| LOC102723883 LINC02549 | rs7767069 | T | 0.85 (0.76-0.96) | 0.008 | 0.91 (0.78-1.08) | 0.28 | 0.0 |
| LOC107986770 ETV1 | rs1568885 | T | 0.67 (0.40-1.10) [§] | 0.11 | 0.84 (0.42-1.66) [§] | 0.61 | 0.0 |
| LOC400456 LOC100132798 | rs10520789 | A | 1.03 (0.86-1.22) | 0.76 | 1.14 (0.90-1.44) | 0.29 | 1.0 |
| MAP2K6 KCNJ16 | rs11870477 | C | 1.07 (0.91-1.25) | 0.42 | 0.92 (0.74-1.14) | 0.46 | 1.0 |
| NUBPL | rs2378945 | A | 1.02 (0.91-1.13) | 0.79 | 1.06 (0.91-1.24) | 0.44 | 0.0 |
| OR5BP1P LRRC55 | rs717117 | G | 0.76 (0.60-0.97) | 0.026 | 0.54 (0.39-0.74) | 0.00012 | 1.0 |
| PDZD2 | rs1532269 | G | 1.01 (0.88-1.16) | 0.86 | 1.03 (0.89-1.20) | 0.68 | 1.0 |
| PLA2G4A FDPSL1 | rs4651370 | A | 1.05 (0.90-1.23) | 0.53 | 1.09 (0.88-1.35) | 0.42 | 0.0 |
| PPP1R9A | rs854547 | G | 1.00 (0.89-1.11) | 0.95 | 1.03 (0.89-1.19) | 0.71 | 0.0 |
| PPP1R9A PON1 | rs854548 | A | 1.01 (0.89-1.15) | 0.89 | 1.04 (0.87-1.24) | 0.67 | 0.0 |
| QKI LOC728275 | rs10945919 | G | 0.88 (0.76-1.03) [†] | 0.11 | 0.79 (0.64-0.97)[†] | 0.027 | 1.0 |
| SEC63P3 | rs437943 | G | 1.10 (0.95-1.28) [†] | 0.21 | 0.98 (0.80-1.20) [†] | 0.82 | 1.0 |
| SLCO1C1 | rs3794271 | C | 0.95 (0.85-1.07) | 0.39 | 0.96 (0.82-1.11) | 0.57 | 1.0 |
| TEC | rs4694890 | C | 0.96 (0.86-1.07) | 0.42 | 1.01 (0.87-1.17) | 0.86 | 0.0 |
| TRMT112P5 | rs1447722 | C | 1.03 (0.92-1.15) | 0.61 | 1.01 (0.87-1.18) | 0.85 | 1.0 |

754

755

756

757

758

759

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

Data on RF was available in 1069 RA patients. Estimates were adjusted for age, sex and country of origin. P<0.05 in bold.

[§] Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance.

[†] Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.

[§] Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.

760 **Table 4.** Overall and RF-specific meta-analysis of the *CNTN5*_{rs1813443}, *MAFB*_{rs607198}, *LINCO2549*_{rs7767069} and *LR*_{rs7767069}
 761 response to anti-TNF drugs.

| Gene | SNP ID | Effect allele | Overall REPAIR+DANBIO (n=1361) | | Overall DREAM (n=706) | | OR |
|-------------------------|-----------|---------------|--|----------------|-------------------------------------|--------------|-------------|
| | | | OR (95% CI) [§] | P | OR (95% CI) [§] | P | |
| CNTN5 | rs1813443 | C | 0.97 (0.84-1.13) [†] | 0.72 | 0.82 (0.68-1.00)[†] | 0.046 | 0.91 |
| HSPEP1 MAFB | rs6071980 | C | 0.83 (0.72-0.97) | 0.020 | 0.88 (0.73-1.06) | 0.18 | 0.85 |
| LOC102723883 LINC02549 | rs7767069 | T | 0.85 (0.76-0.96) | 0.008 | 0.80 (0.70-0.93) | 0.004 | 0.83 |
| OR5BP1P LRRC55 | rs717117 | G | 0.76 (0.60-0.97) | 0.026 | 0.89 (0.67-1.20) | 0.46 | 0.81 |
| Gene | SNP ID | Effect allele | RF-positive patients REPAIR+DANBIO (n=721) | | RF-positive patients DREAM (n=532) | | OR |
| | | | OR (95% CI) [§] | P | OR (95% CI) [§] | P | |
| CNTN5 | rs1813443 | C | 0.79 (0.65-0.97)[†] | 0.023 | 0.84 (0.67-1.04) [†] | 0.12 | 0.81 |
| HSPEP1 MAFB | rs6071980 | C | 0.85 (0.70-1.03) | 0.10 | 0.85 (0.69-1.04) | 0.11 | 0.85 |
| LOC102723883 LINC02549 | rs7767069 | T | 0.91 (0.78-1.08) | 0.28 | 0.82 (0.69-0.97) | 0.022 | 0.87 |
| OR5BP1P LRRC55 | rs717117 | G | 0.54 (0.39-0.74) | 0.00012 | 0.83 (0.60-1.15) | 0.28 | 0.67 |
| Gene | SNP ID | Effect allele | RF-negative patients REPAIR+DANBIO (n=347) | | RF-negative patients DREAM (n=154) | | OR |
| | | | OR (95% CI) [§] | P | OR (95% CI) [§] | P | |
| CNTN5 | rs1813443 | C | 1.14 (0.86-1.53) [†] | 0.34 | 0.76 (0.50-1.16) [†] | 0.20 | 1.00 |
| HSPEP1 MAFB | rs6071980 | C | 0.81 (0.58-1.14) | 0.23 | 1.10 (0.71-1.71) | 0.67 | 0.91 |
| LOC102723883 LINC02549 | rs7767069 | T | 0.81 (0.65-1.01) | 0.058 | 0.76 (0.55-1.04) | 0.08 | 0.79 |
| OR5BP1P LRRC55 | rs717117 | G | 1.52 (0.96-2.42) | 0.07 | 1.10 (0.55-2.19) | 0.80 | 1.38 |

762 Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
 763 Response to anti-TNF defined as ΔDAS28. Data on RF was available in 1068 and RA patients in the discovery (REPAIR+DANBIO) and
 764 Association estimates were adjusted for age, sex and country of origin in the discovery cohort and age and sex in the replication cohort.
 765 [§] Estimates calculated according to a log-additive model of inheritance.
 766 [†] Estimates calculated according to a dominant model of inheritance.
 767 [‡] Estimates calculated according to a recessive model of inheritance.
 768

Agradecimientos



Una tesis doctoral es una combinación entre una carrera de obstáculos, junto con una carrera de fondo, es por esto, que es fundamental arroparse de gente que te aprecien y apoyen de forma desinteresada como son la Familia, compañero y amigos de trabajo, unidos con los amigos independiente al mundo de la investigación. Ya que a lo largo de esta fase académica y laboral se va a necesitar el constante apoyo y ayuda de ellos, desde el punto de vista profesional y personal. Es una lista extensa, le agradezco su granito de arena a tod@s las personas que han estado a mi lado en algún momento de esta experiencia, intentaré no explayarme demasiado centrándome en aquell@s que por diferentes motivos creo que se merecen una mención personal.

Este apartado voy a comenzar dándole las gracias a mi familia papa (Manuel), mama (Ana), tata (Ana María) y sobri (Ángel, los cuales siempre me han dado su apoyo incondicional y me han enseñado que la constancia y el esfuerzo siempre da sus frutos. ¡Muchas Gracias!, siempre estáis ahí apoyándome en mis decisiones, aunque en relación con el ámbito científico muchas de ellas no las comprendáis.

Al mismo nivel quiero darles mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Miguel Ángel López-Nevot, el Dr. Juan Sainz Pérez y el Dr. Rafael Cáliz Cáliz (este último por cuestiones burocráticas, los cuales no entiendo, ha sido excluido de la dirección), que han participado en mi formación científica con un apoyo y asesoramiento continuo a lo largo de la tesis. Al mismo tiempo, quiero referirme y expresar mi gran gratitud a mis compañer@s de laboratorio que constituye este estudio multicéntrico, parte del HUVN, Toñi Chica, Toñi Grande, Mercedes, Carmen, Angela, Paco Luis y Antonio. En el caso del laboratorio en GenYo, siempre las tendré en mis recuerdos y muchísimas gracias por todo a Luz, Carme y Juani (“Las niñas”), en mi segunda etapa a Ana Rodríguez, Ana Moñiz y Antonio. Igualmente, quiero hacer alusión a Tere, Lidia, Manuel Martínez, Alejandra, Servicio de Genómica (Luisja, Alba, Clara, Esperanza, Antonio, Elena, Belén y Ana) ¡Muchas gracias por aportarme y enseñarme tanto, y siempre con esa ilusión y actitud!

También dar las gracias a los diferentes departamentos que me han guiado durante este periodo, Servicio de Reumatología del HUVN (jefe de servicio, Dr. Rafael Cáliz Cáliz), servicio de Inmunología, sección de HLA del HUVN (director de sección, Dr. Miguel Ángel López Nevot), y al servicio de Hematología del HUVN y del laboratorio Genética de las hematopatías malignas y complicaciones asociadas (jefe de servicio Dr. Manuel Jurado Chacón y el investigado principal el Dr. Juan Sainz Pérez).

Una especial mención a tod@s mis compañer@s de GenYo, además de ser un@s grandes científic@s, algun@s de ell@s a lo largo de esta etapa han pasado a ser grandes amig@s, con los cuales he disfrutado muchísimos almuerzos, grandes eventos, fiestas, conciertos, vacaciones veraniegas y viajes.

Pasando a un aspecto personal comienzo dándole las gracias a mis compañeros de piso durante gran parte de este camino Valentín Sánchez (grandes noches de pizza, fútbol y peli de Steven Seagal) y Alex Diaz “Cabezón” (gracias por los asados, pizzas caseras, esas tardes de *vermutitos* y grandes noches de *Rock&Roll*). Quiero también

tener una mención especial con todos los amigos y compañeros que han participado en los viernes de cervezas, grandes momentos de desconexión y relax. Gracias a Alba Antúnez y Alejandro Rubio (Jubi) por esos grandes martes de cervezas. Mi gratitud a MariaDel, Rosi, Agus, Carmen (Limpiadora) y a los miembros de seguridad (Jorge, Miguel Angel y Fernando) por esas conversaciones desinteresadas con las que me ha ayudado muchísimo a centrarme y desestrésame. A su vez, darles las gracias a todos los componentes del Laboratorio 4, comandado por Juan Carlos, y con un@s tripulantes de gran categoría: Mariadel, Rita, Orlando, Javi, Silvia y Carlos. Además, quiero agradecer a todo el mundo que está o ha pasado por la sala de estudio y recordar a mis compañero de la peña de Futbol de GenYo "Juan Carlos". Agradecer también a Joel y Rafa por esos madrugones para ir al Gym. Además, a Patricia Altea, Gabi, Antonio Delgado y Lola, por estas tardes de *Champions* y partidos relevantes de liga y Rugby. Así mismo, agradecer a Víctor y Carmen, y por otra parte Joel, Joan, Diego y Amador, por esas tardes en vuestras casas después de los viernes de tapas, entre otras muchas más actividades.

Durante el desarrollo de la tesis doctoral ha sido muy relevante el *Barrio de Pedro Antonio*, donde disfrutode otras de mis pasiones que es la música, gracias a bares y pubs (Mala Vida, Kronos, Cuneta, Nightrain y Rainbow), con grandes personas como Manolillo, Mariela, Sebas, Javi Pajarillo, Javi Castellano, Jose Sargento, las gemelas, Lemmy, Angela, Jonhy, Jose La Cárcel, *Metalmacho*, etc. Además, entre esas calles se han fraguado grandes amistades (ya con la etiqueta de familia), traducándose en la organizacion de grandes festivales, tales como Nieves y Antonio (Barcia Metal Fest), Llorh (¿Una Rápida?; Skull Metal), Dr. Rafael Contreras (Hellfest), Jose_Ozzy (Graspop), ... y mi mini familia del metal Jose Cantón, Manoly y Andrés Parcero (Leyendas del Rock y mucho más).

Por otro lado, quiero darle las gracias a mi compañer@s universitari@s, Hector, Emmanuel, Celinne, Jesus, Laura Ortega, Nono, Carmen, Laura, Pedro, Victor y Tere. Gracias por siempre estar ahí y vuestro apoyo. Además, gracias poresos momentos de Turismo en nuestros períodos de vacaciones.

También quiero agradecerles y dedicarles este trabajo a mis seres queridos, que por diversos motivos ya no están con nosotros. ¡Muchas gracias!, siempre me acordaré de vosotros y en mi mente estaréis, Abuel@s, Tito Manolo y un gran amigo Juan Carlos.

No me quiero terminar este epigrafe de la tesis sin acordarme de todos los pacientes e individuos sanos que han participado en el estudio. ¡Mil gracias, sin ustedes esta tesis doctoral nunca hubiera sido posible!

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS, ESTA TESIS ES PARTE VUESTRA TAMBIEN!

The Show Must Go on!!!

¡¡La ciencia e Investigación debe continuar!!

Referencias



1. Lee, D.M. and M.E. Weinblatt, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2001. **358**(9285): p. 903-11.
2. Orozco, G., B. Rueda, and J. Martin, *Genetic basis of rheumatoid arthritis*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(10): p. 656-62.
3. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
4. <Ariana Barberá Betancourt. *Características e inmunopatogénesis de la artritis reumatoide..pdf*>.
5. Turesson, C., et al., *Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(8): p. 722-7.
6. Wolfe, F., B. Freundlich, and W.L. Straus, *Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2003. **30**(1): p. 36-40.
7. Avina-Zubieta, J.A., et al., *Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(12): p. 1690-7.
8. Goodson, N., *Coronary artery disease and rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2002. **14**(2): p. 115-20.
9. Gerli, R. and N.J. Goodson, *Cardiovascular involvement in rheumatoid arthritis*. Lupus, 2005. **14**(9): p. 679-82.
10. Libby, P., *Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis*. Am J Med, 2008. **121**(10 Suppl 1): p. S21-31.
11. Maradit-Kremers, H., et al., *Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 722-32.
12. Paulus, H.E., et al., *Equivalence of the acute phase reactants C-reactive protein, plasma viscosity, and Westergren erythrocyte sedimentation rate when used to calculate American College of Rheumatology 20% improvement criteria or the Disease Activity Score in patients with early rheumatoid arthritis*. Western Consortium of Practicing Rheumatologists. J Rheumatol, 1999. **26**(11): p. 2324-31.
13. Bas, S., et al., *Comparative study of different enzyme immunoassays for measurement of IgM and IgA rheumatoid factors*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(6): p. 505-10.
14. Shmerling, R.H. and T.L. Delbanco, *The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility*. Am J Med, 1991. **91**(5): p. 528-34.
15. Visser, H., et al., *Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1996. **55**(3): p. 157-61.
16. Firestein, G.S., *Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Clin Rheumatol, 2005. **11**(3 Suppl): p. S39-44.
17. Cantaert, T., et al., *Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient!* Arthritis Rheum, 2006. **54**(11): p. 3381-9.
18. Vossenaar, E.R., et al., *PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease*. Bioessays, 2003. **25**(11): p. 1106-18.
19. Kastbom, A., et al., *Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project)*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(9): p. 1085-9.
20. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 380-6.
21. Rantapaa-Dahlqvist, S., et al., *Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2741-9.

22. Forslind, K., et al., *Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP)*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(9): p. 1090-5.
23. Vallbracht, I., et al., *Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(9): p. 1079-84.
24. Vossenaar, E.R. and W.J. van Venrooij, *Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(3): p. 107-11.
25. Zendman, A.J., W.J. van Venrooij, and G.J. Pruijn, *Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(1): p. 20-5.
26. van Venrooij, W.J., A.J. Zendman, and G.J. Pruijn, *Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2006. **6**(1): p. 37-41.
27. van der Helm-van Mil, A.H., et al., *Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p. R949-58.
28. Sanchez, M.L., *Anticuerpos monoclonales empleados como agentes terapéuticos en enfermedades inflamatorias*. REVISTA BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA CLÍNICA, 2013. **77**.
29. Nienhuis, R.L. and E. Mandema, *A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor*. Ann Rheum Dis, 1964. **23**: p. 302-5.
30. Young, B.J., et al., *Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis*. Br Med J, 1979. **2**(6182): p. 97-9.
31. Vossenaar, E.R., et al., *Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(2): p. R142-50.
32. Raptopoulou, A., et al., *Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007. **44**(4): p. 339-63.
33. Vincent, C., et al., *Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA*. Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 17-24.
34. Hueber, W., et al., *Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(2): p. 155-9.
35. Goldbach-Mansky, R., et al., *Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset*. Arthritis Res, 2000. **2**(3): p. 236-43.
36. El-Gabalawy, H.S. and J.A. Wilkins, *Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(2): p. 86-9.
37. Hayem, G., et al., *Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26**(1): p. 7-13.
38. Escalona, M., et al., *Anti-Sa sera from patients with rheumatoid arthritis contain at least 2 different subpopulations of anti-Sa antibodies*. J Rheumatol, 2002. **29**(10): p. 2053-60.
39. Kirwan, J.R., *Conceptual issues in scoring radiographic progression in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26**(3): p. 720-5.
40. Pinals, R.S., A.T. Masi, and R.A. Larsen, *Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1981. **24**(10): p. 1308-15.
41. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
42. Machold, K.P., et al., *Very recent onset arthritis--clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease*. J Rheumatol, 2002. **29**(11): p. 2278-87.
43. Quinn, M.A., et al., *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): p. 3039-45.
44. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.

45. Radner, H., et al., *Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(1): p. 114-23.
46. Rezaei, H., et al., *Diagnostic utility of musculoskeletal ultrasound in patients with suspected arthritis--a probabilistic approach*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(5): p. 448.
47. van der Heijde, D.M., et al., *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): p. 916-20.
48. van der Heijde, D.M., et al., *Disease activity score*. Ann Rheum Dis, 1992. **51**(1): p. 140.
49. van Gestel, A.M., et al., *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): p. 34-40.
50. Prevoo, M.L., et al., *Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 44-8.
51. Axelsen, M.B., et al., *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): p. 845-53.
52. Schmidt, W.A., *Imaging: Whole-body MRI in RA: do we still need the rheumatologist?* Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(3): p. 130-2.
53. Raza, K., et al., *Treating very early rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. **20**(5): p. 849-63.
54. Nielen, M.M., et al., *Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 535-7.
55. Sharp, J.T., et al., *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): p. 495-505.
56. Bruynesteyn, K., et al., *Radiography as primary outcome in rheumatoid arthritis: acceptable sample sizes for trials with 3 months' follow up*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(11): p. 1413-8.
57. Backhaus, M., et al., *Arthritis of the finger joints: a comprehensive approach comparing conventional radiography, scintigraphy, ultrasound, and contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(6): p. 1232-45.
58. Klarlund, M., et al., *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): p. 521-8.
59. Krohn, M., et al., *Near-infrared Fluorescence Optical Imaging in Early Rheumatoid Arthritis: A Comparison to Magnetic Resonance Imaging and Ultrasonography*. J Rheumatol, 2015. **42**(7): p. 1112-8.
60. Nieuwenhuis, W.P., et al., *Evaluation of magnetic resonance imaging-detected tenosynovitis in the hand and wrist in early arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(4): p. 869-76.
61. Bruynesteyn, K., et al., *How the type of risk reduction influences required sample sizes in randomised clinical trials*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(11): p. 1368-71.
62. D'Agostino, M.A., et al., *Updating the OMERACT filter: implications for imaging and soluble biomarkers*. J Rheumatol, 2014. **41**(5): p. 1016-24.

63. Tamai, M., 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): p. 2219-20.
64. Nieuwenhuis, W.P., M. Reijnerse, and A.H. van der Helm-van Mil, *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): p. e29.
65. Ji, L., et al., *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, 2015. **18**(8): p. 859-65.
66. Pedersen, J.K., et al., *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**: p. 268.
67. Burgers, L.E., et al., *Long-term outcome of rheumatoid arthritis defined according to the 2010-classification criteria*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(2): p. 428-32.
68. Carmona, L., et al., *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(1): p. 88-95.
69. Loza, E., et al., *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): p. 312-9.
70. <Proyecto EPISER 2000.pdf>.
71. Sanmarti, R., V. Ruiz-Esquide, and M.V. Hernandez, *Rheumatoid arthritis: a clinical overview of new diagnostic and treatment approaches*. Curr Top Med Chem, 2013. **13**(6): p. 698-704.
72. Silman, A.J. and J.E. Pearson, *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S265-72.
73. Ferucci, E.D., D.W. Templin, and A.P. Lanier, *Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature*. Semin Arthritis Rheum, 2005. **34**(4): p. 662-7.
74. MacGregor, A.J., et al., *Low prevalence of rheumatoid arthritis in black-Caribbeans compared with whites in inner city Manchester*. Ann Rheum Dis, 1994. **53**(5): p. 293-7.
75. Dowman, B., et al., *Estimating the burden of rheumatoid arthritis in Africa: A systematic analysis*. J Glob Health, 2012. **2**(2): p. 020406.
76. Bradshaw, D., et al., *Initial burden of disease estimates for South Africa, 2000*. S Afr Med J, 2003. **93**(9): p. 682-8.
77. Klareskog, L., et al., *Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(8): p. 425-33.
78. Rioux, J.D. and A.K. Abbas, *Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 584-9.
79. Lahiri, M., 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): p. 219-26.
80. Deane, K.D., *Can rheumatoid arthritis be prevented?* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2013. **27**(4): p. 467-85.
81. Spector, T.D., *Epidemiology of the rheumatic diseases*. Curr Opin Rheumatol, 1993. **5**(2): p. 132-7.
82. Witkowski, J.M., *[Mechanisms of the immune system ageing and some age-associated diseases]*. Postepy Biochem, 2014. **60**(2): p. 233-9.

83. Symmons, D.P., *Environmental factors and the outcome of rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2003. **17**(5): p. 717-27.
84. Krams, T., et al., *Effect of age at rheumatoid arthritis onset on clinical, radiographic, and functional outcomes: The ESPOIR cohort*. Joint Bone Spine, 2016. **83**(5): p. 511-5.
85. Singh, J.A., et al., *2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2016. **68**(1): p. 1-25.
86. Iikuni, N., et al., *The influence of sex on patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort*. J Rheumatol, 2009. **36**(3): p. 508-11.
87. Kvien, T.K., et al., *Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1069**: p. 212-22.
88. Aurrecochea, E., et al., *Gender-associated comorbidities in rheumatoid arthritis and their impact on outcome: data from GENIRA*. Rheumatol Int, 2017. **37**(4): p. 479-485.
89. Salliot, C., et al., *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): p. 1683-6.
90. Barrett, J.H., et al., *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): p. 1219-27.
91. Doran, M.F., et al., *The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study*. J Rheumatol, 2004. **31**(2): p. 207-13.
92. Rubtsova, K., P. Marrack, and A.V. Rubtsov, *Sexual dimorphism in autoimmunity*. J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2187-93.
93. Pikwer, M., et al., *Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(4): p. 526-30.
94. Karlson, E.W., et al., *Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3458-67.
95. Karlson, E.W. and K. Deane, *Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2012. **38**(2): p. 405-26.
96. Sundstrom, B., I. Johansson, and S. Rantapaa-Dahlqvist, *Diet and alcohol as risk factors for rheumatoid arthritis: a nested case-control study*. Rheumatol Int, 2015. **35**(3): p. 533-9.
97. Ackerman, L.S., *Sex hormones and the genesis of autoimmunity*. Arch Dermatol, 2006. **142**(3): p. 371-6.
98. Libert, C., L. Dejager, and I. Pinheiro, *The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 594-604.
99. Bouman, A., et al., *Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans*. Am J Reprod Immunol, 2004. **52**(1): p. 19-26.
100. Molokhia, M. and P. McKeigue, *Risk for rheumatic disease in relation to ethnicity and admixture*. Arthritis Res, 2000. **2**(2): p. 115-25.
101. Callahan, L.F. and T. Pincus, *Formal education level as a significant marker of clinical status in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(11): p. 1346-57.
102. McEntegart, A., et al., *Effect of social deprivation on disease severity and outcome in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(7): p. 410-3.
103. Maiden, N., et al., *Does social disadvantage contribute to the excess mortality in rheumatoid arthritis patients? Ann Rheum Dis, 1999. 58(9): p. 525-9.*
104. Joplin, S., et al., *Medication adherence in patients with rheumatoid arthritis: the effect of patient education, health literacy, and musculoskeletal ultrasound*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 150658.

105. Oliver, J.E. and A.J. Silman, *Risk factors for the development of rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 2006. **35**(3): p. 169-74.
106. Stolt, P., et al., *Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 1072-6.
107. Vessey, M.P., L. Villard-Mackintosh, and D. Yeates, *Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis*. Contraception, 1987. **35**(5): p. 457-64.
108. Hernandez Avila, M., et al., *Reproductive factors, smoking, and the risk for rheumatoid arthritis*. Epidemiology, 1990. **1**(4): p. 285-91.
109. Afridi, H.I., et al., *Relationship between toxic metals exposure via cigarette smoking and rheumatoid arthritis*. Clin Lab, 2014. **60**(10): p. 1735-45.
110. Gorman, J.D., *Smoking and rheumatoid arthritis: another reason to just say no*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 10-3.
111. Stolt, P., et al., *Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 835-41.
112. Kallberg, H., et al., *Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p. 508-11.
113. Uhlig, T., K.B. Hagen, and T.K. Kvien, *Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1999. **26**(1): p. 47-54.
114. Reckner Olsson, A., T. Skogh, and G. Wingren, *Comorbidity and lifestyle, reproductive factors, and environmental exposures associated with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(10): p. 934-9.
115. Hutchinson, D., et al., *Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA*. Ann Rheum Dis, 2001. **60**(3): p. 223-7.
116. Heliovaara, M., et al., *Smoking and risk of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1993. **20**(11): p. 1830-5.
117. Hazes, J.M., et al., *Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption*. Ann Rheum Dis, 1990. **49**(12): p. 980-2.
118. Symmons, D.P., et al., *Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(11): p. 1955-61.
119. Voigt, L.F., et al., *Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis*. Epidemiology, 1994. **5**(5): p. 525-32.
120. Krishnan, E., T. Sokka, and P. Hannonen, *Smoking-gender interaction and risk for rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(3): p. R158-62.
121. Costenbader, K.H., et al., *Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women*. Am J Med, 2006. **119**(6): p. 503 e1-9.
122. Sugiyama, D., et al., *Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(1): p. 70-81.
123. Saag, K.G., et al., *Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(8): p. 463-9.
124. Nyhall-Wahlin, B.M., et al., *Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(5): p. 601-6.
125. Nagai, S., et al., *Smoking-related interstitial lung diseases*. Curr Opin Pulm Med, 2000. **6**(5): p. 415-9.

126. Matthey, D.L., et al., *Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(3): p. 640-6.
127. Padyukov, L., et al., *A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(10): p. 3085-92.
128. Klareskog, L., L. Padyukov, and L. Alfredsson, *Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases*. *Curr Opin Rheumatol*, 2007. **19**(1): p. 49-54.
129. Klareskog, L., P.K. Gregersen, and T.W. Huizinga, *Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(12): p. 2062-6.
130. Wesley, A., et al., *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): p. 107-12.
131. Pedersen, M., et al., *Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(4): p. R133.
132. Lu, B., et al., *Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(11): p. 1914-22.
133. Rampton, D.S., *The influence of stress on the development and severity of immune-mediated diseases*. *J Rheumatol Suppl*, 2011. **88**: p. 43-7.
134. Nagano, J., et al., *Life events, emotional responsiveness, and the functional prognosis of patients with rheumatoid arthritis*. *Biopsychosoc Med*, 2015. **9**: p. 15.
135. Hollan, I., et al., *Prevention of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(10): p. 952-69.
136. Mathew, A.J. and V. Ravindran, *Infections and arthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014. **28**(6): p. 935-59.
137. La Cava, A., et al., *Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 658-63.
138. van Eden, W., et al., *Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis*. *Nature*, 1988. **331**(6152): p. 171-3.
139. Albani, S., et al., *Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis*. *Nat Med*, 1995. **1**(5): p. 448-52.
140. Gerlag, D.M., 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): p. 638-41.
141. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
142. Mikuls, T.R., et al., *Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(1): p. 83-91.
143. Kisten, Y., et al., *Detection of clinically manifest and silent synovitis in the hands and wrists by fluorescence optical imaging*. *RMD Open*, 2015. **1**(1): p. e000106.
144. Gent, Y.Y., 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**: p. 266.
145. Kraan, M.C., et al., *Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(8): p. 1481-8.

146. Gent, Y.Y., et al., *Macrophage positron emission tomography imaging as a biomarker for preclinical rheumatoid arthritis: findings of a prospective pilot study*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(1): p. 62-6.
147. Nieuwenhuis, W.P., et al., *The Course of Bone Marrow Edema in Early Undifferentiated Arthritis and Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study at Bone Level*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. **68**(5): p. 1080-8.
148. Szekanecz, Z. and A.E. Koch, *Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'*. *Arthritis Res Ther*, 2008. **10**(5): p. 224.
149. Szekanecz, Z. and A.E. Koch, *Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007. **3**(11): p. 635-43.
150. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. *Science*, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
151. Lainer-Carr, D. and E. Brahn, *Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007. **3**(8): p. 434-42.
152. Koch, A.E., *Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(6): p. 951-62.
153. Veale, D.J. and U. Fearon, *Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. **20**(5): p. 941-7.
154. Satoh, M., E.L. Treadwell, and W.H. Reeves, *Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNP/Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera*. *J Immunol Methods*, 1995. **182**(1): p. 51-62.
155. Bendele, A.M., *Animal models of osteoarthritis*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001. **1**(4): p. 363-76.
156. Palmer, D.G., *The anatomy of the rheumatoid lesion*. *Br Med Bull*, 1995. **51**(2): p. 286-95.
157. Iannone, F., et al., *Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(11): p. 2706-13.
158. Zvaifler, N.J. and G.S. Firestein, *Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(6): p. 783-9.
159. Croia, C., et al., *One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2019. **37**(3): p. 347-357.
160. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2016. **388**(10055): p. 2023-2038.
161. Cuda, C.M., R.M. Pope, and H. Perlman, *The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2016. **12**(9): p. 543-58.
162. Bazzazi, H., et al., *Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease*. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2018. **17**(1): p. 68-77.
163. Arend, W.P. and G.S. Firestein, *Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(10): p. 573-86.
164. Kinne, R.W., et al., *Macrophages in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res*, 2000. **2**(3): p. 189-202.
165. Jain, S., T.H. Tran, and M. Amiji, *Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis*. *Biomaterials*, 2015. **61**: p. 162-77.
166. Li, J., H.C. Hsu, and J.D. Mountz, *Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal*. *Curr Rheumatol Rep*, 2012. **14**(5): p. 445-54.
167. Kennedy, A., et al., *Macrophages in synovial inflammation*. *Front Immunol*, 2011. **2**: p. 52.

168. Zhu, W., et al., *Anti-Citrullinated Protein Antibodies Induce Macrophage Subset Disequilibrium in RA Patients*. *Inflammation*, 2015. **38**(6): p. 2067-75.
169. Vandooren, B., et al., *Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(4): p. 966-75.
170. Fukui, S., et al., *M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1958.
171. Tangye, S.G., et al., *SnapShot: Interactions between B Cells and T Cells*. *Cell*, 2015. **162**(4): p. 926-6 e1.
172. Schinnerling, K., et al., *Skewing dendritic cell differentiation towards a tolerogenic state for recovery of tolerance in rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(6): p. 517-27.
173. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(1): p. 19-30.
174. Segura, E., et al., *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 336-48.
175. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(23): p. 2205-19.
176. Smiljanovic, B., et al., *Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint*. *Ann Rheum Dis*, 2018. **77**(2): p. 300-308.
177. Sprangers, S., T.J. de Vries, and V. Everts, *Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells*. *J Immunol Res*, 2016. **2016**: p. 1475435.
178. Meusch, U., et al., *In vitro response pattern of monocytes after tmTNF reverse signaling predicts response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 256.
179. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(10): p. 593-601.
180. de Siqueira, M.B., et al., *Enhanced neutrophil phagocytic capacity in rheumatoid arthritis related to the autoantibodies rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptides*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015. **16**: p. 159.
181. Canet, L.M., et al., *Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients*. *Pharmacogenomics J*, 2019. **19**(1): p. 83-96.
182. Sanchez-Maldonado, J.M., et al., *Steroid hormone-related polymorphisms associate with the development of bone erosions in rheumatoid arthritis and help to predict disease progression: Results from the REPAIR consortium*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 14812.
183. Eyles, J.L., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(9): p. 500-10.
184. International HapMap, C., et al., *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 851-61.
185. Gerli, R., et al., *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): p. 549-55.
186. Kritas, S.K., et al., *Mast cell involvement in rheumatoid arthritis*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2013. **27**(3): p. 655-60.
187. Lee, H.P., et al., *Lemnalol attenuates mast cell activation and osteoclast activity in a gouty arthritis model*. *J Pharm Pharmacol*, 2015. **67**(2): p. 274-85.
188. Durand, 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): p. 588-96.
189. Smolen, J.S., D. Aletaha, and K. Redlich, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?* *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(4): p. 235-43.
190. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 429-42.
191. Huber, L.C., et al., *Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(6): p. 669-75.
192. Bartok, B. and G.S. Firestein, *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev*, 2010. **233**(1): p. 233-55.
193. Lindhout, E., et al., *Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 5949-56.
194. Filer, A., *The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(3): p. 413-9.
195. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *T-cell regulation in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(3): p. 212-7.
196. Panayi, G.S., *Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism?* *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(2): p. 58-9.
197. Stahl, E.A., et al., *Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(6): p. 508-14.
198. Yap, H.Y., et al., *Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development*. *Cells*, 2018. **7**(10).
199. Viatte, S. and A. Barton, *Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(4): p. 395-408.
200. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. *Nature*, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
201. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
202. Matsuzaki, G. and M. Umemura, *Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections*. *Microbiol Immunol*, 2007. **51**(12): p. 1139-47.
203. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(6): p. 652-7.
204. Lubberts, E., M.I. Koenders, and W.B. van den Berg, *The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(1): p. 29-37.
205. Mellado, M., et al., *T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 384.
206. Carvalheiro, H., J.A. da Silva, and M.M. Souto-Carneiro, *Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2013. **12**(3): p. 401-9.
207. Boissier, M.C., et al., *Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, 2009. **76**(1): p. 10-4.
208. Kinnunen, T., et al., *Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells*. *Blood*, 2013. **121**(9): p. 1595-603.
209. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors*. *Science*, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
210. Ahern, D.J. and F.M. Brennan, *The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators?* *Immunol Lett*, 2011. **136**(2): p. 115-21.
211. Jin, H.M., et al., *Dysregulated osteoclastogenesis is related to natural killer T cell dysfunction in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(10): p. 2639-50.

212. Ng, Y.S., et al., *Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 927-34.
213. Herve, M., et al., *CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1583-93.
214. Isnardi, I., et al., *IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 746-57.
215. Adlowitz, D.G., 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): p. e0128269.
216. Mewar, D. and A.G. Wilson, *Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(10): p. 648-55.
217. van Venrooij, W.J., J.J. van Beers, and G.J. Pruijn, *Anti-CCP Antibody, a Marker for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 268-85.
218. Winchester, R., et al., *Association of Elevations of Specific T Cell and Monocyte Subpopulations in Rheumatoid Arthritis With Subclinical Coronary Artery Atherosclerosis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(1): p. 92-102.
219. Bugatti, S., et al., *B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 681678.
220. Scheinman, R., *NF-kappaB and Rheumatoid Arthritis: Will Understanding Genetic Risk Lead to a Therapeutic Reward?* For Immunopathol Dis Therap, 2013. **4**(2): p. 93-110.
221. Sanchez-Ramon, S., F.J. Lopez-Longo, and L. Carreno, *[Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]*. Reumatol Clin, 2011. **6S3**: p. S20-4.
222. Shiozawa, S. and K. Tsumiyama, *Pathogenesis of rheumatoid arthritis and c-Fos/AP-1*. Cell Cycle, 2009. **8**(10): p. 1539-43.
223. Szekanecz, Z., et al., *Chemokines and chemokine receptors in arthritis*. Front Biosci (Schol Ed), 2010. **2**: p. 153-67.
224. Schulze-Koops, H. and J.R. Kalden, *The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. **15**(5): p. 677-91.
225. Zhu, X., et al., *Disrupted Resting-State Default Mode Network in Betel Quid-Dependent Individuals*. Front Psychol, 2017. **8**: p. 84.
226. Thompson, C., R. Davies, and E. Choy, *Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis*. Cytokine, 2016. **86**: p. 92-99.
227. Halloran, M.M., et al., *The role of an epithelial neutrophil-activating peptide-78-like protein in rat adjuvant-induced arthritis*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7492-500.
228. Nile, C.J., et al., *Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes*. Immunology, 2010. **130**(2): p. 172-80.
229. Chizzolini, C., J.M. Dayer, and P. Miossec, *Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance?* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. 246.
230. Auger, I., et al., *New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(4): p. 591-4.
231. Noack, M. and P. Miossec, *Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(4): p. 365-383.
232. Mateen, S., et al., *Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Chim Acta, 2016. **455**: p. 161-71.
233. Dayer, J.M. and E. Choy, *Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(1): p. 15-24.
234. Rana, A.K., et al., *Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis*. Int Immunopharmacol, 2018. **65**: p. 348-359.

235. Rose-John, S., et al., *Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(2): p. 227-36.
236. Hofbauer, L.C., et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 2-12.
237. Seckinger, P., et al., *Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4181-4.
238. Belge, K.U., et al., *The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3536-42.
239. Smiljanovic, B., et al., *The multifaceted balance of TNF-alpha and type I/II interferon responses in SLE and RA: how monocytes manage the impact of cytokines*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(11): p. 1295-309.
240. Sonderegger, I., et al., *GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2281-94.
241. Aggarwal, B.B., et al., *Inflammation and cancer: how hot is the link?* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1605-21.
242. Shahrara, S., et al., *IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3884-91.
243. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
244. Shimizu, S., et al., *Quantitative histologic studies on the pathogenesis of periarticular osteoporosis in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(1): p. 25-31.
245. Renault, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 667-76.
246. Wolk, K., et al., *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1309-23.
247. Lubberts, E., *Th17 cytokines and arthritis*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 43-53.
248. Harada, A., et al., *Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(5): p. 559-64.
249. Booth, G., et al., *Gene expression profiles at different stages of collagen-induced arthritis*. Autoimmunity, 2008. **41**(7): p. 512-21.
250. Rosengren, S., et al., *CXCL13: a novel biomarker of B-cell return following rituximab treatment and synovitis in patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(3): p. 603-10.
251. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
252. Mackay, F. and C.R. Mackay, *The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 113-5.
253. Bosello, S., et al., *BAFF and rheumatic autoimmune disorders: implications for disease management and therapy*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007. **20**(1): p. 1-8.
254. Huard, B., et al., *T cell costimulation by the TNF ligand BAFF*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6225-31.
255. Xia, X.Z., et al., *TAC1 is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation*. J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 137-43.
256. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 807-17.
257. Pers, J.O., et al., *BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1050**: p. 34-9.

258. Hamilton, J.A. and P.P. Tak, *The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(5): p. 1210-21.
259. Strand, V. and A.F. Kavanaugh, *The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43 Suppl 3**: p. iii10-iii16.
260. Feldmann, M. and S.R. Maini, *Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 7-19.
261. Fischer, J.A., 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): p. 51-62.
262. Kunwar, S., K. Dahal, and S. Sharma, *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): p. 1065-75.
263. Burmester, G.R., et al., *Efficacy and safety of mavrimumab in subjects with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(9): p. 1445-52.
264. Boissier, M.C., *Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis*. Joint Bone Spine, 2011. **78**(3): p. 230-4.
265. Bessis, N., et al., *The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 867-75.
266. Bali, D., et al., *Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families*. Genes Immun, 1999. **1**(1): p. 28-36.
267. Grubb, R., et al., *Rheumatoid arthritis--a gene transfer disease*. Exp Clin Immunogenet, 1999. **16**(1): p. 1-7.
268. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 30-7.
269. Aho, K., et al., *Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins*. J Rheumatol, 1986. **13**(5): p. 899-902.
270. Jarvinen, P. and K. Aho, *Twin studies in rheumatic diseases*. Semin Arthritis Rheum, 1994. **24**(1): p. 19-28.
271. Seldin, M.F., et al., *The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(6): p. 1071-9.
272. Okada, Y., et al., *Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 376-81.
273. Yarwood, A., T.W. Huizinga, and J. Worthington, *The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(2): p. 199-209.
274. Plenge, R.M., 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): p. 1044-60.
275. Cribbs, A.P., 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): p. 2344-54.
276. Hou, S., et al., *PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Mod Rheumatol, 2013. **23**(1): p. 50-60.
277. Perricone, C., F. Ceccarelli, and G. Valesini, *An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(10): p. 599-608.
278. Dieguez-Gonzalez, R., 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): p. R42.

279. Diogo, D., Y. Okada, and R.M. Plenge, *Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis: recent findings and challenges*. *Curr Opin Rheumatol*, 2014. **26**(1): p. 85-92.
280. Stastny, P., *Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 1976. **57**(5): p. 1148-57.
281. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
282. Viatte, S., D. Plant, and S. Raychaudhuri, *Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. **9**(3): p. 141-53.
283. Raychaudhuri, S., 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): p. 291-6.
284. Orozco, G., et al., *Novel rheumatoid arthritis susceptibility locus at 22q12 identified in an extended UK genome-wide association study*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(1): p. 24-30.
285. Kim, K., 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): p. e13.
286. Eyre, S., et al., *High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2012. **44**(12): p. 1336-40.
287. Messemaker, T.C., T.W. Huizinga, and F. Kurreeman, *Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications*. *J Autoimmun*, 2015. **64**: p. 74-81.
288. Pers, T.H., et al., *Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 5890.
289. Farh, K.K., et al., *Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants*. *Nature*, 2015. **518**(7539): p. 337-43.
290. Westra, H.J., et al., *Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations*. *Nat Genet*, 2013. **45**(10): p. 1238-1243.
291. Trynka, G., et al., *Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants*. *Nat Genet*, 2013. **45**(2): p. 124-30.
292. Mathews, R.J., 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): p. 1202-10.
293. Lemire, M., et al., *Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6326.
294. John, S., et al., *Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(1): p. 54-64.
295. Amos, C.I., et al., *High-density SNP analysis of 642 Caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2q33*. *Genes Immun*, 2006. **7**(4): p. 277-86.
296. Cornelis, F., et al., *New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10746-50.
297. Shiozawa, S., et al., *Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis*. *Int Immunol*, 1998. **10**(12): p. 1891-5.
298. Jawaheer, D., et al., *A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases*. *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(4): p. 927-36.
299. MacKay, K., et al., *Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(3): p. 632-9.

300. Jawaheer, D., et al., *Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(4): p. 906-16.
301. Eyre, S., et al., *Investigation of susceptibility loci identified in the UK rheumatoid arthritis whole-genome scan in a further series of 217 UK affected sibling pairs*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 729-35.
302. Worthington, J., *Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2005. **25 Suppl**: p. 16-20.
303. Becker, K.G., et al., *The genetic association database*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 431-2.
304. Orozco, G., et al., *Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(1): p. 219-24.
305. Gregersen, P.K. and F. Batliwalla, *PTPN22 and rheumatoid arthritis: gratifying replication*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(7): p. 1952-5.
306. Begovich, A.B., et al., *A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(2): p. 330-7.
307. International HapMap, C., *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.
308. Wellcome Trust Case Control, C., *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
309. Terao, C., S. Raychaudhuri, and P.K. Gregersen, *Recent Advances in Defining the Genetic Basis of Rheumatoid Arthritis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2016. **17**: p. 273-301.
310. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1597-601.
311. Stastny, P., *Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 1978. **298**(16): p. 869-71.
312. Viatte, S., et al., *Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response*. JAMA, 2015. **313**(16): p. 1645-56.
313. de Almeida, D.E., S. Ling, and J. Holoshitz, *New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope*. FEBS Lett, 2011. **585**(23): p. 3619-26.
314. Turesson, C., et al., *The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(6): p. R1386-93.
315. Gorman, J.D., et al., *Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 400-12.
316. Hall, F.C., et al., *Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis*. QJM, 1996. **89**(11): p. 821-9.
317. Chung, I.M., et al., *Rheumatoid Arthritis: The Stride from Research to Clinical Practice*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(6).
318. Boots, A.M., et al., *Identification of an altered peptide ligand based on the endogenously presented, rheumatoid arthritis-associated, human cartilage glycoprotein-39(263-275) epitope: an MHC anchor variant peptide for immune modulation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(4): p. R71.
319. Nakae, S., et al., *TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2565-8.

320. Monney, L., et al., *Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 536-41.
321. Anderson, A.C., et al., *Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells*. Science, 2007. **318**(5853): p. 1141-3.
322. Wang, F., et al., *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8+ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft*. Cell Immunol, 2007. **250**(1-2): p. 68-74.
323. Sabatos, C.A., et al., *Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1102-10.
324. Parham, C., et al., *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
325. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
326. Kochi, Y., et al., *A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility*. Nat Genet, 2010. **42**(6): p. 515-9.
327. Kirino, Y. and E.F. Remmers, *Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(7): p. 401-14.
328. Suzuki, A., et al., *Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 395-402.
329. Chen, R., J. Luo, and D. Zhang, *[Progress of molecular genetics research on rheumatoid arthritis]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2015. **32**(5): p. 728-33.
330. Kurko, J., et al., *Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2013. **45**(2): p. 170-9.
331. Stanford, S.M. and N. Bottini, *PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(10): p. 602-11.
332. Shchetynsky, K., et al., *Discovery of new candidate genes for rheumatoid arthritis through integration of genetic association data with expression pathway analysis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 19.
333. Krintel, S.B., 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**(8): p. 577-89.
334. Cui, J., 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): p. e1003394.
335. Plant, D., 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**(3): p. 645-53.
336. Nunez, C., et al., *IL4 in the 5q31 context: association studies of type 1 diabetes and rheumatoid arthritis in the Spanish population*. Immunogenetics, 2008. **60**(1): p. 19-23.
337. Song, G.G., et al., *Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Immunol Invest, 2013. **42**(6): p. 455-69.
338. Zhang, J., et al., *The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Cytokine, 2011. **56**(2): p. 351-5.
339. Lee, Y.H., et al., *Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(1): p. 81-7.

340. Pawlik, A., et al., *The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 2005. **26**(1): p. 48-51.
341. Liu, R., et al., *Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(6): p. 6915-22.
342. Samson, M., et al., *Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2499-503.
343. Vasilopoulos, Y., 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**(4): p. 701-4.
344. Prots, I., et al., *Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1491-500.
345. Marinou, I., 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): p. 2549-56.
346. Lard, L.R., et al., *Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1841-8.
347. van der Helm-van Mil, A.H., et al., *A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(2): p. 433-40.
348. Li, W., et al., *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), 2016. **55**(2): p. 357-66.
349. van der Helm-van Mil, A.H., *Risk estimation in rheumatoid arthritis: from bench to bedside*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(3): p. 171-80.
350. Zhou, Q.M., et al., *Assessing incremental value of biomarkers with multi-phase nested case-control studies*. Biometrics, 2015. **71**(4): p. 1139-49.
351. Wessels, J.A., et al., *A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(6): p. 1765-75.
352. Yarwood, A., et al., *A weighted genetic risk score using all known susceptibility variants to estimate rheumatoid arthritis risk*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(1): p. 170-6.
353. Gleicher, N. and D.H. Barad, *Gender as risk factor for autoimmune diseases*. J Autoimmun, 2007. **28**(1): p. 1-6.
354. de Hair, M.J., et al., *The clinical picture of rheumatoid arthritis according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria: is this still the same disease?* Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 389-93.
355. Masi, A.T., *Incidence of rheumatoid arthritis: do the observed age-sex interaction patterns support a role of androgenic-anabolic steroid deficiency in its pathogenesis?* Br J Rheumatol, 1994. **33**(8): p. 697-9.
356. Goemaere, S., et al., *Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition*. J Rheumatol, 1990. **17**(12): p. 1620-2.
357. Cutolo, M. and L. Castagnetta, *Immunomodulatory mechanisms mediated by sex hormones in rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **784**: p. 237-51.
358. Imrich, R., *The role of neuroendocrine system in the pathogenesis of rheumatic diseases (minireview)*. Endocr Regul, 2002. **36**(2): p. 95-106.
359. Mravcova, M., et al., *Genetics of neuroendocrine factors in rheumatoid arthritis*. Horm Metab Res, 2015. **47**(6): p. 411-7.
360. Wilder, R.L., *Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol Suppl, 1996. **44**: p. 10-2.

361. Cutolo, M., *Androgens in rheumatoid arthritis: when are they effectors?* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. 126.
362. Trigunaite, A., J. Dimo, and T.N. Jorgensen, *Suppressive effects of androgens on the immune system.* Cell Immunol, 2015. **294**(2): p. 87-94.
363. Soldano, S., et al., *Endothelin and sex hormones modulate the fibronectin synthesis by cultured human skin scleroderma fibroblasts.* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(4): p. 599-602.
364. Kissick, H.T., et al., *Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(27): p. 9887-92.
365. Alpizar-Rodriguez, D., et al., *The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(8): p. 1254-1263.
366. Ostensen, M. and P.M. Villiger, *The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy.* Semin Immunopathol, 2007. **29**(2): p. 185-91.
367. Inoue, K., E. Inoue, and Y. Imai, *Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **434**(4): p. 740-5.
368. Maurer, A.J., et al., *Pain and sex hormones: a review of current understanding.* Pain Manag, 2016. **6**(3): p. 285-96.
369. Tengstrand, B., et al., *Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone, and estradiol in men with rheumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation.* J Rheumatol, 2003. **30**(11): p. 2338-43.
370. Cutolo, M., et al., *New roles for estrogens in rheumatoid arthritis.* Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(6): p. 687-90.
371. Lateef, A. and M. Petri, *Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases.* J Autoimmun, 2012. **38**(2-3): p. J170-6.
372. Deighton, C.M., M.J. Watson, and D.J. Walker, *Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs.* J Rheumatol, 1992. **19**(11): p. 1663-7.
373. D'Elia, H.F., et al., *Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 2003. **30**(7): p. 1456-63.
374. Herrmann, M., J. Scholmerich, and R.H. Straub, *Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 166-86.
375. Brattsand, R. and M. Linden, *Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies.* Aliment Pharmacol Ther, 1996. **10 Suppl 2**: p. 81-90; discussion 91-2.
376. Imrich, R., et al., *Determinants of adrenal androgen hypofunction in premenopausal females with rheumatoid arthritis.* Physiol Res, 2014. **63**(3): p. 321-9.
377. Sternberg, E.M., et al., *A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4771-5.
378. Chrousos, G.P., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.* N Engl J Med, 1995. **332**(20): p. 1351-62.
379. van Oosten, M.J., et al., *Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(4): p. R159.
380. Kovats, S., *Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways.* Cell Immunol, 2015. **294**(2): p. 63-9.
381. Hughes, G.C. and D. Choubey, *Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone.* Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(12): p. 740-51.
382. Escribese, M.M., et al., *Estrogen inhibits dendritic cell maturation to RNA viruses.* Blood, 2008. **112**(12): p. 4574-84.

383. Cutolo, M., A. Sulli, and R.H. Straub, *Estrogen metabolism and autoimmunity*. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(6-7): p. A460-4.
384. Gonzalez, D.A., et al., *Sex hormones and autoimmunity*. *Immunol Lett*, 2010. **133**(1): p. 6-13.
385. Panchanathan, R., et al., *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): p. 7031-8.
386. Sakiani, S., N.J. Olsen, and W.J. Kovacs, *Gonadal steroids and humoral immunity*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(1): p. 56-62.
387. Riggs, B.L., *The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(10): p. 1203-4.
388. Liang, Y., et al., *E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1beta-induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**(1): p. 105.
389. Miller, L. and J.S. Hunt, *Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone*. *J Immunol*, 1998. **160**(10): p. 5098-104.
390. Hughes, G.C., *Progesterone and autoimmune disease*. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(6-7): p. A502-14.
391. Hughes, G.C., et al., *Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2029-33.
392. Meier, A., et al., *Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 955-9.
393. Arruvito, L., et al., *NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5746-53.
394. Baudino, L., et al., *Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies*. *Springer Semin Immunopathol*, 2006. **28**(2): p. 175-84.
395. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. *Cell*, 1986. **47**(6): p. 921-8.
396. Li, G., et al., *Celastrol inhibits lipopolysaccharide-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte invasion through suppression of TLR4/NF-kappaB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e68905.
397. Fox, D.A., *The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(4): p. 598-609.
398. Feldmann, M. and R.N. Maini, *Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?* *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 163-96.
399. Kong, Y.Y., et al., *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand*. *Nature*, 1999. **402**(6759): p. 304-9.
400. Baeuerle, P.A., *The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(1): p. 63-80.
401. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
402. Wang, S., et al., *IkappaBalpha polymorphism at promoter region (rs2233408) influences the susceptibility of gastric cancer in Chinese*. *BMC Gastroenterol*, 2010. **10**: p. 15.
403. Abdallah, A., et al., *Inhibitor kappa B-alpha (IkappaB-alpha) promoter polymorphisms in UK and Dutch sarcoidosis*. *Genes Immun*, 2003. **4**(6): p. 450-4.
404. Pereira, S.G. and F. Oakley, *Nuclear factor-kappaB1: regulation and function*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(8): p. 1425-30.
405. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 693-733.

406. Brown, K.D., E. Claudio, and U. Siebenlist, *The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2008. **10**(4): p. 212.
407. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(1): p. 7-11.
408. Stein, J.P., et al., *Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(3): p. 666-75.
409. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
410. Beinke, S. and S.C. Ley, *Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology*. *Biochem J*, 2004. **382**(Pt 2): p. 393-409.
411. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
412. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(1): p. 49-62.
413. Camandola, S. and M.P. Mattson, *NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases*. *Expert Opin Ther Targets*, 2007. **11**(2): p. 123-32.
414. Hacker, H. and M. Karin, *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. *Sci STKE*, 2006. **2006**(357): p. re13.
415. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
416. Xiao, G., A. Fong, and S.C. Sun, *Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 30099-105.
417. Liang, C., M. Zhang, and S.C. Sun, *beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870*. *Cell Signal*, 2006. **18**(8): p. 1309-17.
418. Duran, A., M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat, *Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation*. *EMBO J*, 2003. **22**(15): p. 3910-8.
419. Chen, L.F., et al., *NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(18): p. 7966-75.
420. Asahara, H., et al., *High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis*. *Biochem Mol Biol Int*, 1995. **37**(5): p. 827-32.
421. Marok, R., et al., *Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(4): p. 583-91.
422. Gilston, V., et al., *NF-kappa B activation in human knee-joint synovial tissue during the early stage of joint inflammation*. *Biochem Soc Trans*, 1997. **25**(3): p. 518S.
423. Miyazawa, K., et al., *Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(3): p. 793-803.
424. Pomerantz, J.L. and D. Baltimore, *Two pathways to NF-kappaB*. *Mol Cell*, 2002. **10**(4): p. 693-5.
425. Makarov, S.S., *NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(4): p. 200-6.
426. Weih, D.S., Z.B. Yilmaz, and F. Weih, *Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1909-19.
427. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 525-35.

428. Basak, S., V.F. Shih, and A. Hoffmann, *Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3139-50.
429. Vaira, S., et al., *RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3897-902.
430. Wu, L., et al., *RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha-dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells*. Immunity, 1998. **9**(6): p. 839-47.
431. O'Dell, J.R., *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2591-602.
432. Tornero Molina, J., et al., *[Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis]*. Reumatol Clin, 2010. **6**(1): p. 23-36.
433. Thompson, P.W., J.R. Kirwan, and C.G. Barnes, *Practical results of treatment with disease-modifying antirheumatoid drugs*. Br J Rheumatol, 1985. **24**(2): p. 167-75.
434. Cronstein, B.N., *Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(2): p. 163-72.
435. Abramson, S.B. and G. Weissmann, *The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(1): p. 1-9.
436. Canete, J.D. and J.L. Pablos, *Biologic therapy in rheumatoid arthritis*. Curr Top Med Chem, 2013. **13**(6): p. 752-9.
437. Mitchell, D.M., et al., *Survival, prognosis, and causes of death in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(6): p. 706-14.
438. Eberhardt, K.B., et al., *Disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis: relation to IgG, IgA, and IgM rheumatoid factor*. Ann Rheum Dis, 1990. **49**(11): p. 906-9.
439. Wallis, R.S., et al., *Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(9): p. 1261-5.
440. Imperato, A.K., C.O. Bingham, 3rd, and S.B. Abramson, *Overview of benefit/risk of biological agents*. Clin Exp Rheumatol, 2004. **22**(5 Suppl 35): p. S108-14.
441. Curtis, J.R., et al., *Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(4): p. 1125-33.
442. Rodriguez-Valverde, V., et al., *[Not Available]*. Reumatol Clin, 2006. **2 Suppl 2**: p. S52-9.
443. Ellerin, T., R.H. Rubin, and M.E. Weinblatt, *Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3013-22.
444. Hyrich, K.L., et al., *Anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis: an update on safety*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(12): p. 1538-43.
445. Prevoo, M.L., et al., *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): p. 1101-5.
446. van Riel, P.L. and A.M. van Gestel, *Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i28-31.
447. Makinen, H., et al., *Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis?* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(10): p. 1410-3.
448. Erhardt, C.C., et al., *Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study*. Ann Rheum Dis, 1989. **48**(1): p. 7-13.
449. Felson, D.T., 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): p. 573-86.

450. Ohrndorf, S., et al., *Musculoskeletal ultrasound and other imaging modalities in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2013. **25**(3): p. 367-74.
451. Mohajerani, P., et al., *Fluorescence-aided tomographic imaging of synovitis in the human finger*. *Radiology*, 2014. **272**(3): p. 865-74.
452. Slooter, M.D., et al., *Near infrared fluorescence imaging for early detection, monitoring and improved intervention of diseases involving the joint*. *Connect Tissue Res*, 2015. **56**(2): p. 153-60.
453. Smolen, J.S., et al., *Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force*. *Ann Rheum Dis*, 2016. **75**(1): p. 3-15.
454. Lillegraven, S., 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): p. 681-6.
455. Ostergaard, M. and S. Moller-Bisgaard, *Rheumatoid arthritis: Is imaging needed to define remission in rheumatoid arthritis?* *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(6): p. 326-8.
456. Umicevic Mirkov, M., et al., *Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2013. **72**(8): p. 1375-81.
457. Nyholt, D.R., *A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other*. *Am J Hum Genet*, 2004. **74**(4): p. 765-9.
458. Chen, B., et al., *SNP_tools: A compact tool package for analysis and conversion of genotype data for MS-Excel*. *BMC Res Notes*, 2009. **2**: p. 214.
459. Gabriel, S.B., et al., *The structure of haplotype blocks in the human genome*. *Science*, 2002. **296**(5576): p. 2225-9.
460. Li, Y., et al., *A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans*. *Cell*, 2016. **167**(4): p. 1099-1110 e14.
461. Schirmer, M., et al., *Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity*. *Cell*, 2016. **167**(7): p. 1897.
462. Ter Horst, R., et al., *Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses*. *Cell*, 2016. **167**(4): p. 1111-1124 e13.
463. Schirmer, M., et al., *Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity*. *Cell*, 2016. **167**(4): p. 1125-1136 e8.
464. Orru, V., et al., *Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease*. *Cell*, 2013. **155**(1): p. 242-56.
465. Aguirre-Gamboa, R., et al., *Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits*. *Cell Rep*, 2016. **17**(9): p. 2474-2487.
466. Assarsson, E., et al., *Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95192.
467. Lundberg, M., et al., *Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(15): p. e102.
468. Niwa, T., et al., *Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones*. *Xenobiotica*, 1998. **28**(6): p. 539-47.
469. Santos, C.A. and J.I. Boullata, *An approach to evaluating drug-nutrient interactions*. *Pharmacotherapy*, 2005. **25**(12): p. 1789-800.
470. Zhai, G., et al., *Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(4): p. e1002025.
471. Yan, J., et al., *TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination*. *J Mol Cell Biol*, 2014. **6**(2): p. 154-63.

472. Liptrott, N.J., et al., *The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(3): p. 497-508.
473. Mimura, H., et al., *Effects of cytokines on CYP3A4 expression and reversal of the effects by anti-cytokine agents in the three-dimensionally cultured human hepatoma cell line FLC-4*. Drug Metab Pharmacokinet, 2015. **30**(1): p. 105-10.
474. Lappalainen, T., et al., *Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans*. Nature, 2013. **501**(7468): p. 506-11.
475. Cutolo, M., et al., *Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(2): p. 820-7.
476. Bord, S., et al., *Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2309-14.
477. Cutolo, M., et al., *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): p. 1087-97.
478. Recker, R.R., et al., *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): p. 897-904.
479. Ostensen, M., *Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **876**: p. 131-43; discussion 144.
480. Kuiper, S., et al., *Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2001. **28**(8): p. 1809-16.
481. Erlandsson, M.C., et al., *Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus*. Immunology, 2001. **103**(1): p. 17-25.
482. Mo, R., et al., *Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6023-9.
483. Da Silva, J.A., *Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **876**: p. 102-17; discussion 117-8.
484. Medina, K.L., A. Strasser, and P.W. Kincade, *Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2059-67.
485. Beagley, K.W. and C.M. Gockel, *Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(1): p. 13-22.
486. Andersson, A., et al., *Estrogen regulates T helper 17 phenotype and localization in experimental autoimmune arthritis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 32.
487. Van Booven, D., et al., *Cytochrome P450 2C9-CYP2C9*. Pharmacogenet Genomics, 2010. **20**(4): p. 277-81.
488. Sullivan-Klose, T.H., et al., *The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(4): p. 341-9.
489. Cuppen, B.V., et al., *Personalized biological treatment for rheumatoid arthritis: a systematic review with a focus on clinical applicability*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(5): p. 826-39.
490. Liu, C., 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): p. 575-81.
491. Acosta-Colman, I., et al., *GWAS replication study confirms the association of PDE3A-SLC1C1 with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics, 2013. **14**(7): p. 727-34.

492. Plant, D., et al., *Replication of association of the PTPRC gene with response to anti-tumor necrosis factor therapy in a large UK cohort*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(3): p. 665-70.
493. Cui, J., et al., *Rheumatoid arthritis risk allele PTPRC is also associated with response to anti-tumor necrosis factor alpha therapy*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1849-61.
494. Dai, R., et al., *Estrogen regulates transcription factors STAT-1 and NF-kappaB to promote inducible nitric oxide synthase and inflammatory responses*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 6998-7005.
495. Wihlen, B., et al., *Estrogen receptor subtype- and promoter-specific modulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent transcription*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(6): p. 977-86.
496. Kobayashi, S., et al., *Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(3): p. 306-11.
497. Willing, M., et al., *Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(4): p. 695-705.
498. Masi, L., et al., *The role of osteoprotegerin (OPG) and estrogen receptor (ER-alpha) gene polymorphisms in rheumatoid arthritis*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2007. **4**(2): p. 156-60.
499. Lian, K., et al., *Estrogen receptor alpha genotype is associated with a reduced prevalence of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(8): p. 972-8.
500. Albagha, O.M., et al., *Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(1): p. 128-34.
501. Sano, M., et al., *Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(1): p. 378-83.
502. Karsten, C.M. and J. Kohl, *The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases*. Immunobiology, 2012. **217**(11): p. 1067-79.
503. Wu, J., et al., *A novel polymorphism of Fc gamma R11a (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1059-70.
504. Guilliams, M., et al., *The function of Fc gamma receptors in dendritic cells and macrophages*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 94-108.
505. Bournazos, S., et al., *Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**(2): p. 244-54.
506. Nimmerjahn, F., *Activating and inhibitory Fc gamma Rs in autoimmune disorders*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(4): p. 305-19.
507. Koene, H.R., et al., *The Fc gamma R11A-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(10): p. 1813-8.
508. Zuniga, R., et al., *Low-binding alleles of Fc gamma receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in Hispanic patients*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(2): p. 361-7.
509. Nieto, A., et al., *Involvement of Fc gamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 735-9.
510. Manger, K., et al., *Fc gamma receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(9): p. 786-92.
511. Latiano, A., et al., *Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22, NFKB1, and FcGR11A genes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(10): p. 1212-9.

512. Lee, Y.H., J.D. Ji, and G.G. Song, *Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis*. J Rheumatol, 2008. **35**(11): p. 2129-35.
513. Montes, A., et al., *FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors*. Pharmacogenomics, 2015. **16**(4): p. 333-45.
514. Lee, Y.H., S.C. Bae, and G.G. Song, *Functional FCGR3A 158 V/F and IL-6 -174 C/G polymorphisms predict response to biologic therapy in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Rheumatol Int, 2014. **34**(10): p. 1409-15.
515. Kim, D.H., et al., *FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2720-5.
516. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
517. Weng, W.K. and R. Levy, *Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3940-7.
518. Musolino, A., et al., *Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(11): p. 1789-96.
519. Robledo, G., et al., *Association of the FCGR3A-158F/V gene polymorphism with the response to rituximab treatment in Spanish systemic autoimmune disease patients*. DNA Cell Biol, 2012. **31**(12): p. 1671-7.
520. Bhatnager, R., et al., *Association of rs6259 polymorphism with SHBG levels and Polycystic Ovary Syndrome in Indian population: a case control study*. Mol Biol Rep, 2019. **46**(2): p. 2131-2138.
521. Han, Z., et al., *AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis*. Autoimmunity, 1998. **28**(4): p. 197-208.
522. Kichaev, G., et al., *Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power*. Am J Hum Genet, 2019. **104**(1): p. 65-75.
523. Iwaszko, M., et al., *Influence of CD94 and NKG2A variants on susceptibility to rheumatoid arthritis and efficacy of anti-TNF treatment*. Joint Bone Spine, 2016. **83**(1): p. 75-9.
524. Iwaszko, M., et al., *Influence of NKG2D Genetic Variants on Response to Anti-TNF Agents in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Genes (Basel), 2018. **9**(2).
525. Suhre, K., et al., *Connecting genetic risk to disease end points through the human blood plasma proteome*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14357.
526. Piotrowski, P., et al., *Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(2): p. 1343-7.
527. Kabalak, G., et al., *Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations*. Hum Immunol, 2010. **71**(1): p. 74-8.
528. Sode, J., et al., *Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics J, 2018. **18**(1): p. 81-86.
529. Bank, S., et al., *Polymorphisms in the NFkB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2019. **49**(7): p. 890-903.
530. Gregersen, P.K., et al., *REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2009. **41**(7): p. 820-3.

531. Ali, F.R., et al., *An investigation of rheumatoid arthritis loci in patients with early-onset psoriasis validates association of the REL gene*. Br J Dermatol, 2013. **168**(4): p. 864-6.
532. Varade, J., et al., *Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(4): p. 711-2.
533. Chen, F., et al., *Genetic Variation in the REL Gene Increases Risk of Behcet's Disease in a Chinese Han Population but That of PRKCQ Does Not*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147350.
534. Ellinghaus, E., et al., *Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies susceptibility locus at REL*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(4): p. 1133-40.
535. Bowes, J., et al., *Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(8): p. 1350-4.
536. Tang, H., et al., *TLR10 and NFKBIA contributed to the risk of hip osteoarthritis: systematic evaluation based on Han Chinese population*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10243.
537. Vrgoc, G., et al., *Interleukin-17 and Toll-like Receptor 10 genetic polymorphisms and susceptibility to large joint osteoarthritis*. J Orthop Res, 2018. **36**(6): p. 1684-1693.
538. Nishikawa, R., et al., *Genetic prediction of the effectiveness of biologics for psoriasis treatment*. J Dermatol, 2016. **43**(11): p. 1273-1277.
539. Gebura, K., et al., *Polymorphisms within Genes Involved in Regulation of the NF-kappaB Pathway in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
540. Wang, H., et al., *Correlations between TLR polymorphisms and inflammatory bowel disease: a meta-analysis of 49 case-control studies*. Immunol Res, 2019. **67**(1): p. 142-150.
541. Sode, J., et al., *Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated with Anti-TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0139781.
542. Bank, S., et al., *Polymorphisms in the Toll-Like Receptor and the IL-23/IL-17 Pathways Were Associated with Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145302.
543. Bank, S., et al., *Genetically determined high activity of IL-12 and IL-18 in ulcerative colitis and TLR5 in Crohns disease were associated with non-response to anti-TNF therapy*. Pharmacogenomics J, 2018. **18**(1): p. 87-97.
544. Oliveira-Tore, C.F., et al., *Genetic Polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 9 as Susceptibility Factors for the Development of Ankylosing Spondylitis and Psoriatic Arthritis*. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 1492092.
545. Yi, X., et al., *Evaluation of the Relationship Between Common Variants in the TLR-9 Gene and Hip Osteoarthritis Susceptibility*. Genet Test Mol Biomarkers, 2019. **23**(6): p. 373-379.
546. Zheng, M., et al., *Association between TLR-9 gene rs187084 polymorphism and knee osteoarthritis in a Chinese population*. Biosci Rep, 2017. **37**(5).
547. Huang, C.M., et al., *Association of toll-like receptor 9 gene polymorphism in Chinese patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan*. Rheumatol Int, 2012. **32**(7): p. 2105-9.
548. Bank, S., 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): p. 526-34.
549. Cho, W.K., et al., *Association of Polymorphisms in Toll-Like Receptors 4 and 9 with Autoimmune Thyroid Disease in Korean Pediatric Patients*. Int J Endocrinol, 2017. **2017**: p. 2304218.
550. Plenge, R.M., et al., *TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(12): p. 1199-209.

551. Viatte, S., et al., *Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(12): p. 1984-90.
552. Padyukov, L., et al., *A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(2): p. 259-65.
553. Jiang, X., et al., *An ImmunoChip-based interaction study of contrasting interaction effects with smoking in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2016. **55**(1): p. 149-55.
554. Dong, X., et al., *ACPAs promote IL-1beta production in rheumatoid arthritis by activating the NLRP3 inflammasome*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(3): p. 261-271.
555. Boyle, A.P., et al., *Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1790-7.
556. Zhang, Y., et al., *Endochondral ossification pathway genes and postmenopausal osteoporosis: Association and specific allele related serum bone sialoprotein levels in Han Chinese*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16783.
557. Summers, K.L., J.L. O'Donnell, and D.N. Hart, *Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(1): p. 39-44.
558. Koch, A.E., et al., *Distribution of CD45RA and CD45RO T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis synovial tissue*. J Clin Immunol, 1990. **10**(4): p. 192-9.
559. Aruffo, A., et al., *The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 949-52.
560. Calvo, J., et al., *Identification of a natural soluble form of human CD5*. Tissue Antigens, 1999. **54**(2): p. 128-37.
561. Lydyard, P.M., P.Y. Youinou, and A. Cooke, *CD5-positive B cells in rheumatoid arthritis and chronic lymphocytic leukemia*. Immunol Today, 1987. **8**(2): p. 37-9.
562. Youinou, P., et al., *The importance of CD5-positive B cells in nonorgan-specific autoimmune diseases*. Scand J Rheumatol Suppl, 1988. **76**: p. 243-9.
563. Jamin, C., et al., *Cell-free CD5 in patients with rheumatic diseases*. Immunol Lett, 1992. **31**(1): p. 79-83.
564. Consuegra-Fernandez, M., et al., *Clinical and experimental evidence for targeting CD6 in immune-based disorders*. Autoimmun Rev, 2018. **17**(5): p. 493-503.
565. Ramos-Casals, M., et al., *High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(9): p. 1056-9.
566. Dauphinee, M.J., et al., *The expression and function of CD3 and CD5 in patients with primary Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(4): p. 420-9.
567. Aibar, J., et al., *Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes*. J Crit Care, 2015. **30**(5): p. 914-9.
568. Noh, G.W. and K.Y. Lee, *Circulating soluble CD5 in atopic dermatitis*. Mol Cells, 1998. **8**(5): p. 618-22.
569. Zimmerman, A.W., et al., *Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells*. Blood, 2006. **107**(8): p. 3212-20.
570. Nair, P., et al., *CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 116-30.
571. Alonso-Ramirez, R., et al., *Rationale for Targeting CD6 as a Treatment for Autoimmune Diseases*. Arthritis, 2010. **2010**: p. 130646.
572. Burgueno-Bucio, E., C.A. Mier-Aguilar, and G. Soldevila, *The multiple faces of CD5*. J Leukoc Biol, 2019. **105**(5): p. 891-904.

573. Li, Y., et al., *CD6 as a potential target for treating multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(10): p. 2687-2692.
574. Consuegra-Fernandez, M., et al., *Genetic and experimental evidence for the involvement of the CD6 lymphocyte receptor in psoriasis*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(10): p. 898-906.
575. Rodriguez, P.C., et al., *The anti-CD6 antibody itolizumab provides clinical benefit without lymphopenia in rheumatoid arthritis patients: results from a 6-month, open-label Phase I clinical trial*. Clin Exp Immunol, 2018. **191**(2): p. 229-239.
576. Rodriguez, P.C., et al., *A clinical exploratory study with itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis*. Results Immunol, 2012. **2**: p. 204-11.
577. Krupashankar, D.S., et al., *Efficacy and safety of itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III study*. J Am Acad Dermatol, 2014. **71**(3): p. 484-92.
578. Kofler, D.M., et al., *The Link Between CD6 and Autoimmunity: Genetic and Cellular Associations*. Curr Drug Targets, 2016. **17**(6): p. 651-65.
579. Krintel, S.B., et al., *CD6 and syntaxin binding protein 6 variants and response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in Danish patients with rheumatoid arthritis*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38539.
580. Yan, J. and R.W. Aldrich, *BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(20): p. 7917-22.
581. Shi, X.Z., et al., *Leucine-rich repeats containing protein functions in the antibacterial immune reaction in stomach of kuruma shrimp Marsupenaeus japonicus*. Fish Shellfish Immunol, 2017. **61**: p. 130-137.
582. Tatematsu, M., et al., *LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4933-42.
583. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation*. Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S3.
584. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
585. Becker, C., et al., *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 491-501.
586. Gadaleta, R.M., et al., *Corrigendum to 'Fibroblast growth factor 19 modulates intestinal microbiota and inflammation in presence of farnesoid x receptor': [EBioMedicine 54 (2020) 102719]*. EBioMedicine, 2020. **57**: p. 102873.
587. Gadaleta, R.M., et al., *Fibroblast Growth Factor 19 modulates intestinal microbiota and inflammation in presence of Farnesoid X Receptor*. EBioMedicine, 2020. **54**: p. 102719.
588. Rioja, I., et al., *Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2257-67.

