Presencia del polimorfismo -308 del TNF-α y su relación con inmunogenicidad, niveles séricos de fármacos anti-TNF-α y respuesta clínica en pacientes con Artritis Reumatoide y Espondiloartritis en el Hospital Militar Central.

Por:

Flor Vanessa Díaz Pupo

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2015

Presencia del polimorfismo -308 del TNF-α y su relación con inmunogenicidad, niveles séricos de fármacos anti-TNF-α y respuesta clínica en pacientes con Artritis Reumatoide y Espondiloartritis, en el Hospital Militar Central.

Flor Vanessa Díaz Pupo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora:
María Consuelo Romero PhD,

Codirectores:
Giovanni Delgado Msc Bioquímica,
Giovanny Ballesteros MD, Internista Reumatólogo,
Grupo de investigación en Inmunogenética

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2015

Nota de Salvedad de responsabilidad institucional:

" La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Dedicatoria

Solo a ti Dios, Rey de Reyes, Abbá.

La ausencia de mi Padre físico me hizo volcar mi corazón a Tu cuidado diario y a entender que dejar mi tierra y mi parentela solo significaba que los planes que tú tienes para mí son más grandes y más altos que lo que mi pensamiento puede tener.

A mi hermosa Madre y hermanos, quienes desde la distancia me han enseñado a no perder mi identidad como hija, como hermana y como amiga, recordándome que esta etapa es tan solo una porción dentro de los planes que tú, Dios, tienes para mí.

"Porque aguas serán cavadas en el desierto, y torrentes en la soledad. El lugar seco se convertirá en estanque, y el sequedal en manaderos de aguas"

Isaías 35:6b-7a

Gracias Dios, por cada persona que pusiste delante de mí en esta nación, bendícelos y que nunca olviden:

"who also made us sufficient as ministers of a new covenant; not of the letter, but of the spirit: for the letter killeth, but the spirit giveth life"

2 Corintios 3:6

Jesucristo Tú eres mi principio y mi fin.

Tabla de contenido

Dedicatoria 3
Tabla de contenido 5
Índice de tablas 8
Índice de figuras 9
Abreviaturas 10
Resumen 13
Abstract……. 14
1. Generalidades 17
1.1. Carga económica de las enfermedades reumáticas 18
1.2 Generalidades del TNF-α. 22
1.3 Tratamiento clásico de la AR y las EAS 26
1.3.1 Generalidades de fármacos biológicos 27
1.3.1.1 Clasificación de los fármacos anti- TNF-α. 28
1.3.1.1.1 Aspectos generales del Adalimumab 31
1.3.1.1.2 Aspectos generales del Infliximab 31
1.3.1.1.3 Aspectos generales del Etanercept 32
1.3.2 Inmunogenicidad de los fármacos anti- TNF-α. 33
1.3.2.1 Mecanismos inmunológicos que pueden intervenir en el desarrollo de ADAs 34
1.3.2.2 Otros factores asociados a inmunogenicidad 36
1.3.2.3 Métodos para detectar ADAs contra fármacos anti- TNF-α 38
1.4 Espondiloartropatias 41
1.4.1 Definición 41
1.4.2 Diagnóstico de las EAS 43
1.4.3 Etiología de las EAS 43
1.4.4 Factores genéticos relacionados a las EAS 44
1.4.5 Citocinas involucradas en el proceso inflamatorio de las EAS. 45
1.4.6 Polimorfismo -308 del TNF-α en EAS 46
1.4.7 Inmunogenicidad en EAS 48
1.5 Artritis Reumatoide 50
1.5.1 Definición 50
1.5.2 Diagnóstico de la AR 50
1.5.3 Etiología de la AR 52
1.5.4 Factores genéticos relacionados a la AR 53

1.5.5 Epidemiología de la AR 54
1.5.6 Citocinas involucradas en el proceso inflamatorio de la AR 55
1.5.7 Polimorfismo -308 del TNF-α en AR 58
1.6 Inmunogenicidad en AR 60
2 Objetivos 61
3 Metodología 62
3.1 Generalidades del estudio 62
3.2 Extracción de ADN genómico 63
3.3 PCR-RFLP 63
3.4 Detección de HLA-B27 64
3.5 Determinación de la concentración de fármacos biológicos (anti-TNF-α) y anticuerpos anti- fármacos anti-TNF (ADAs) en suero 65
3.6 Medición de PCR ultrasensible 69
3.7 Mediciones de velocidad de sedimentación globular 69
4. Resultados 71
4.1 Población de pacientes con EAS 71
4.1.1 Características demográficas, índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes que cursan con EAS tratados con anti-TNF-α en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014) 71
4.1.2 Determinación del SNP -308 del TNF-α. 72
4.1.3 Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, en pacientes con EAS 76
4.1.4 Asociación entre los niveles séricos de anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con EAS 77
4.1.5 Asociación entre ADAs e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con EAS .. 79
4.1.6 Representación de resultados por biológico: Adalimumab 80
4.1.6.1 Asociación entre la presencia del SNP -308 TNF- α, y variables clínicas en pacientes con EAS en tratamiento con Adalimumab 80
4.1.6.2 Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con los niveles séricos de PCR y VSG en pacientes en tratamiento con Adalimumab 80
4.1.6.3 Correlación entre el nivel sérico de Adalimumab y ADAs contra Adalimumab respecto al tratamiento antirreumático concomitante en pacientes con EAS 81
4.1.6.4 Correlación entre la concentración de Adalimumab, índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS 81
4.1.6.5 Correlación entre la concentración de ADAs contra Adalimumab: Índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS. . 82
4.1.7 Representación de resultados por biológico: infliximab. 83

4.1.7.1 Asociación entre genotipos, variables clínicas, nivel sérico de infliximab y adas contra infliximab en pacientes con eas. 83

4.1.7.2 Asociación entre el nivel sérico de Infliximab, ADAs e índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes con EAS 84

4.1.8 Representación de resultados por biológico: Etanercept 84

4.1.8.1 Asociación entre los niveles séricos de Etanercept, PCR y VSG en pacientes con EAS... 84

4.2 Población de pacientes con Artritis Reumatoide 85

4.2.1 Características demográficas de los pacientes que cursan con artritis anti- TNF-α en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014) 85

4.2.2 Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs en pacientes con AR ... 86

4.2.3 Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α variables clínicas en pacientes con AR. 87

4.2.4 Asociación entre los niveles séricos de anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con AR 90

4.2.5 Asociación entre adas e índices de actividad de la enfermedaden pacientes con ar. 91

4.2.6 Representación de resultados por biológico: Adalimumab 92

4.2.6.1 Asociación entre SNP -308 TNF-α, variables clínicas en pacientes con AR y en tratamiento con Adalimumab 92

4.2.6.2 Correlación entre el nivel sérico de Adalimumab, tratamiento antirreumático concomitante y antimalárico en pacientes con AR..... 92

4.2.6.3 Correlación entre la concentración de Adalimumab y ciertos antecedentes clínicos en pacientes que cursan con AR..... 92

4.2.7 Representación de resultados por biológico: Infliximab 93

4.2.7.1 Asociación entre genotipos, variables clínicas, nivel sérico de Infliximab y ADAS contra Infliximab en pacientes con AR 93

4.2.7.2 Asociación entre los niveles séricos de Infliximab e índices de actividad en pacientes con AR..... 93

4.2.7.3 Asociación entre la concentración de ADAs contra Infliximab e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con AR 95

4.2.8 Representación de resultados por biológico Etanercept 97

5. Discusión y recomendaciones. 97

6. Conclusiones y recomendaciones 104

Referencias bibliográficas 106

Anexos…… 114

Índice de tablas

Tabla 1.Nomenclatura de los Agentes Biológicos 28
Tabla 2.Fármacos Biológicos Anti-TNF disponibles para el tratamiento. 30
Tabla 3. Diferencias y relaciones entre las respuestas inmunes frente a antígenos exógenos clásicos y proteínas autólogas (terapéuticos). 35
Tabla 4. Criterios de Clasificación ASAS para espondiloartritis. 43
Tabla 5.Criterio diagnóstico de AR. 51
Tabla 6.Conjunto de variables y puntuación para el cómputo global. 51
Tabla 7. Los alelos más relevantes asociados a la susceptibilidad de la AR, según estudios de asociación GWAS. 54
Tabla 8. Actividad de ciertas citocinas implicadas en la patogénesis de la AR, tomado de (98). 58
Tabla 9. Interpretación de la concentración de Adalimumab. 65
Tabla 10. Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-Adalimumab. 66
Tabla 11. Interpretación de la concentración de Infliximab. 67
Tabla 12. Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-IFX. 68
Tabla 13. Interpretación de la concentración de Etanercept. 68
Tabla 14 Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-IFX. 69
Tabla 15.Interpretación de PCR Ultrasensible. 69
Tabla 16. Características demográficas de los pacientes que cursan con EAS en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014). 71
Tabla 17. Distribución de frecuencias respecto a sexo, proteína C reactiva, VSG y presencia del alelo HLA-B27 en pacientes con EAS. 72
Tabla 18. Frecuencia entre genotipo/alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con EAS y controles sanos. 75
Tabla 19. Asociación entre genotipos, variables clínicas, Anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) y ADAs en pacientes con EAS. 75
Tabla 20. Asociación entre alelos, variables clínicas, Anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) y ADAs en pacientes con EAS. 76
Tabla 21.Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, así como la frecuencia según los genotipos y alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con EAS. 77
Tabla 22. Asociación entre los niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con EAS. 78
Tabla 23. Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con los niveles séricos de PCR y VSG en pacientes con EAS. 80
Tabla 24.Correlación entre la concentración de ADAs contra Adalimumab: índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS. 83
Tabla 25. Asociación entre el nivel sérico de Infliximab, ADAs contra Infliximab, índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes con EAS. 84
Tabla 26. Características demográficas de los pacientes que cursan con AR en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014). 85
Tabla 27. Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, así como la frecuencia según los genotipos y alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con AR. 87
Tabla 28. Asociación entre genotipos, variables clínicas, Anti- TNF-α y ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) en pacientes con AR. 89
Tabla 29. Asociación entre alelos, variables clínicas, Anti- TNF-α y ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) en pacientes con AR. 90
Tabla 30. Asociación entre los niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con AR. 91
Tabla 31. Asociación entre la presencia y/o ausencia de ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con AR. 91

Índice de figuras

Figura 1.Diagrama simplificado de 5 antagonistas del TNF-α…….. 30
Figura 2. ELISA puente (en inglés, *Bridging ELISA*), tomado de (56)……. 40
Figura 3.Producto de PCR antes de digestión con la enzima NcoI…… 73
Figura 4. Producto de PCR después de digestión con la enzima NcoI…….. 74
Figura 5. Secuencia para el genotipo TNF1/TNF1…….74
Figura 6. Diagrama de caja y bigote para la variable BASDAI, BASFI, VSG y PCR respecto a la concentración de ADAs contra fármacos Anti-TNF-α…….. 79
Figura 7.Gráfica de Dispersión, Adalimumab (μg/mL) Vs VSG (mm/H)……82
Figura 8.Gráfica de Dispersión ADAs contra Adalimumab (UA/mL) Vs VSG (mm/H)……..83
Figura 9. Plots de medias para las variables DAS28VSG, DAS28PCR, HAQ, CDAI respecto al alelo G y A en pacientes con AR……88
Figura 10. Plots de medias entre los niveles de Infliximab respecto al índice DAS28 por VSG y PCR, HAQ y CDAI en pacientes con AR…… 94
Figura 11. Plot de medias entre los niveles de ADAs contra Infliximabrespecto al índice DAS28 por VSG y PCR, HAQ y CDAI en pacientes con AR……96

Abreviaturas

ACR: American College of Rheumatology.

ADA: Adalimumab.

ADAs: Anti-drug-antibodies.

AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos.

ANAS. Anticuerpos antinucleares.

Anti-CCP: Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado.

APRIL: A proliferation-inducing ligand.

AR: Artritis Reumatoide.

ASAS: Ankylosing Spondilytis Assessment study.

BAFF: B-cell activating factor.

BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity.

BASFI: The Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index.

BCG: Bacillus Calmette-Guerin.

BMP: Bone morphogenetic protein.

CCL21: Chemokine (C-C motif) ligand 21.

CCR6: Chemokine receptor 6.

CDR: Regiones Determinantes de Complementariedad.

CD11: Componente alfa de varias integrinas.

CD69: Proteína lectina Tipo C codificada por el gen CD69.

Células NK: Células Natural Killer.

CHO: Chinese Hamster ovary.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

CTLA4: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.

DAS 28:Disease Activity Score Calculator for Rheumatoid Arthritis.

dbSNP: The Single Nucleotide Polymorphism database.

DMARDS:Disease-modifying antirheumatic drugs.

EA: Espondilitis Anquilosante.

EAS: Espondiloartritis.

EASI. Espondiloartritis Indiferenciada.

EIA: Semi fluid-phase enzyme-immunoassay.

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima.

ELISAs: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ETA: Etanercept.

EVA: Escala Visual Análoga.

FCGR2A: Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32).

GWAS: Genome-wide association study.

HACA: Human anti chimeric antibodies.

HAHA: Human anti human antibodies.

HAMA: Human anti-mouse antibody.

HAQ-S: Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies.

HLA-B27: Antígeno leucocitario humano B27.

HMSA: Homogeneous mobility-shift assay.

HRQOL: Health-related quality of life.

IGAS: International Genetic of Ankylosing Spondylitis Consortium.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-10: Interleuquina 10.

IL-12: Interleuquina 12.

IL-15: Interleuquina 15.

IL-17: Interleuquina 17.

IL-18: Interleuquina 18.

IL-1α: Interleuquina 1 alfa.

IL-1β: Interleuquina 1 Beta.

IL-23: Interleuquina 23.

IL-32: Interleuquina 32.

IL-4: Interleuquina 4.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-6: Interleuquina 6.

INF-γ: Interferon gamma.

IFX: Infliximab.

IPD:Immuno Polymorphism Database.

LPL: Lipoproteina Lipasa.

LTA. Linfotoxina alfa.

LTs: Leucotrienos.

LT-α: Linfotoxina alfa.

LTβ: Linfotoxina Beta.

MAb: Antibody monoclonal, Anticuerpo Monoclonal.

MIF: Macrophage migration-inhibitory factor.

MTX. Metrotexato.

Nabs: Neutralizing antibodies.

NF-kB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NNAbs:Non-neutralizing antibodies.

OMS: Organization Mundial de la Salud.

PAD14: Peptidylarginine deiminase type IV.

PAF: Factor Activador de Plaquetas.

PDGF: Platelet-derived growth factor

PGs: Prostaglandinas.

pM: Picomolar.

PMN: Polimorfonucleares.

PTPN22: Protein tyrosine phosphatase.

RANKL: Receptor activator of nuclear factor*kB* RANK ligand.

RGA: reporter gene assay.

RIA: Fluid-phase radioimmunoassay.

SE: Shared Epitope.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

STAT4: The signal transducer and activator of transcription 4.

sTNF: TNF soluble o libre.

TDT:Transmission disequilibrium testing.

TGF-β: Factor de Crecimiento transformante Beta.

TLR: Receptor tipo Toll.

tmTNF: TNF transmembrana.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TNFβ: Linfotoxina B.

TRAF1: Tumor necrosis factor receptor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VH: Cadena Pesada.

VL: Cadena Ligera.

Resumen

Introducción: El TNF-α está involucrado en la fisiopatología de las Espondiloartritis (EAS) y la Artritis Reumatoide (AR). La presencia de polimorfismos a nivel de la región promotora se ha relacionado con susceptibilidad, en especial el -308 del TNF-α (A/G).

El tratamiento con Anti-TNF-α disminuye la inflamación y es el tratamiento de segunda línea previa falla al manejo convencional. Sin embargo, algunos pacientes fallan al tratamiento debido a la inmunogenicidad generada contra los fármacos.

Objetivo: Establecer la presencia del polimorfismo -308 del TNF-α y su asociación con inmunogenicidad, niveles séricos de fármacos anti-TNF-α con la actividad clínica en pacientes con AR y EAS en el Hospital Militar Central.

Materiales y métodos: Un total de 266 individuos: 55 con EAS, 56 con AR tratados con Adalimumab, Infliximab o Etanercept y 155 controles, fueron analizados. Se obtuvieron variables clínicas sobre el nivel de actividad de la enfermedad, funcionalidad del paciente y variables socio-demográficas. Se determinó la presencia del SNP -308 del TNF-α por PCR-RFLP y tanto las concentraciones séricas de los fármacos biológicos como de ADAs (en inglés, *Anti-drug-antibodies*) se llevaron a cabo mediante la técnica de ELISA con el Kit PROMONITOR®. Se realizaron asociaciones estadísticas con la prueba Chi^2, comparaciones de medianas con el test U Mann-Whitney y también se usó el coeficiente de correlación de Pearson, con un nivel de significancia de $p<0.05$.

Resultados: La presencia del alelo G en los pacientes con EAS y en tratamiento con Adalimumab mostraron significancia al comparar los niveles de la proteína C reactiva (PCR) (p=0.02), y la presencia del alelo A se asoció con discapacidad en los pacientes con AR a través del índice HAQ-DI (p=0.044). Adicionalmente, los pacientes con EAS, ADAs positivos y en tratamiento con Infliximab, manifestaron índices clínicos activos y de disfunción (BASDAI p=0.0029 y BASFI p=0.016). En los pacientes con AR se halló la misma tendencia (DAS28VSG p=0.019, CDAI p=0.008 y HAQ-DI p=0.04).

Conclusiones: Estos resultados sugieren la falta de respuesta frente a fármacos biológicos por la presencia de ADAs, en especial para Infliximab, y la influencia del SNP-308 del TNF-α sobre algunos de los marcadores de inflamación e índices de disfunción.

Palabras clave: Polimorfismo -308 (G/A), Factor de Necrosis Tumoral, Artritis Reumatoide, Espondiloartritis, fármacos anti-TNF-α.

Abstract

Introduction: TNF-α is involved in the pathophysiology of Spondyloarthritis (SpA) and Rheumatoid Arthritis (RA). The presence of polymorphisms at the promoter region level has been related to susceptibility, especially the TNF-α -308.

The treatment with anti-TNF-α reduces inflammation and is the second choice treatment. However, some patients fail treatment due to the immunogenicity generated against drugs.

Objective: Identify the presence of SNP -308 TNF-α and its association with immunogenicity, serum levels of anti-TNF-α drugs and clinical activity in patients with RA and SpA.

Methods: A total of 266 individuals 55 with SpA, 56 with RA treated with Adalimumab, Infliximab or Etanercept and 155 controls were analyzed. Clinical variables on the level of disease activity, patient functionality and sociodemographic variables were obtained. The presence of SNP -308 TNF-α was obtained by PCR-RFLP. The serum concentrations of both biological and ADAs drugs were carried out by ELISA with PROMONITOR® Kit. Statistical analyzes were performed with Chi^2test statistical associations, the Mann-Whitney U test was used to look for difference between the comparisons of the median and Pearson correlation coefficient was also used, with a significance level of $p < 0.05$.

Results: The presence of the G allele in patients with EAS and treated with Adalimumab showed significance when comparing the levels of C-reactive protein (CRP) (p=0.02), and the presence of the A allele was associated with disability in patients RA through the index HAQ-DI ($p = 0.044$). Additionally, patients with SpA, ADAs positive and treated with Infliximab maintained active and dysfunction clinical indexes (BASDAI p=0.0029 and BASFI p =0.016). In patients with AR the same trend was identified (DAS28VSGp = 0.019, CDAI p = 0.008 and HAQ-DI p = 0.04).

Conclusions: These results suggest the lack of response to biological drugs due to the presence of ADAs, particularly for Infliximab, and the influence of the SNP-308 of TNF-α on markers of inflammation and dysfunction indexes.

Keywords: Polymorphism -308 (G/A), Tumor Necrosis Factor, Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthritis, anti-TNF-α drugs, Anti-drug-antibodies.

Introducción

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citocina proinflamatoria que ha sido implicada en la patogénesis de un gran número de enfermedades reumáticas. La ubicación del gen dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y las actividades biológicas que lo caracterizan sugiere que los polimorfismos dentro de este locus pueden contribuir a la patogénesis de un amplio grupo de enfermedades.

El SNP-308 del TNF-α (A/G) ha sido identificado como un posible factor asociado a susceptibilidad en las EAS y la AR. Aunque la acción específica tanto para el alelo mutante como para el alelo silvestre sigue siendo un tema de debate (1, 2).

Por otro lado, el uso de terapia biológica para algunos pacientes con AR y EAS puede ser favorable. Sin embargo existe un porcentaje del 30% al 40% de los pacientes que no generan respuesta al tratamiento. Es por ello que se han desarrollado estudios para establecer factores predictores de falla terapéutica. Algunos de ellos involucran la presencia de ADAs, otros hablan de concentraciones efectivas del medicamento, y actualmente estudios se centran en la búsqueda de una posible relación con la presencia de ciertos polimorfismos, como en el caso del SNP -308 del TNF-α (3-5).

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue examinar la presencia del SNP-308 y su asociación con inmunogenicidad, niveles séricos de fármacos anti-TNF-α con la actividad clínica en pacientes con AR y EAS en el Hospital Militar Central en Bogotá, Colombia.

Resultados exploratorios del equipo de Investigación del Hospital Militar, en pacientes con EAS demostraron diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP-308 del TNF-α comparado con individuos sanos (6).

Estos estudios toman gran importancia debido a la carencia de antecedentes relacionados con el SNP -308, la inmunogenicidad y la concentración sérica de fármacos biológicos anti-TNF

en pacientes con EAS y AR, lo cual ofrecería un mayor poder predictivo y de evolución de cada paciente.

Para tal fin se usó la técnica de PCR-RFLP para la detección del SNP-308 y la técnica de ELISA para la determinación de la concentración de los fármacos biológico (Adalimumab, Infliximab y Etanercept), así como los ADAs contra cada medicamento.

Una posible debilidad en el estudio podría haber sido el tamaño de la muestra. Por lo que se sugiere la confirmación de estos resultados en una muestra mayor y el desarrollo del estudio en otras poblaciones colombianas, para confirmar los hallazgos obtenidos. Así como la implementación de otra técnica de detección de ADAs que pudiera permitir la diferenciación entre ADAs no neutralizantes y neutralizantes.

Sin duda el establecer marcadores genéticos como modelos predictivos de respuesta y terapias personalizadas seria uno de los recursos que pudiera generarse frente a los pacientes que han fallado al tratamiento convencional y también repercutiría en la disminución de costos en cuanto al tratamiento.

1. Generalidades

El sistema inmunológico se caracteriza por su capacidad de reconocimiento de cualquier molécula extraña al organismo (antígeno) y por lo general, potencialmente perjudicial. Este reconocimiento también llamado presentación antigénica es el primer paso para organizar una respuesta encaminada a la neutralización de dicho antígeno, lo cual lleva a inferir que para poder reconocer lo extraño, se debe saber distinguir lo propio, por tal razón el sistema inmunológico está constantemente realizando un *screening* que le permite realizar esta distinción.

Sin embargo, esta capacidad de diferenciación puede fallar; es ahí cuando el sistema inmune reconoce como extraña una molécula propia, desencadenando una respuesta inmunológica frente a ella, proceso conocido como autoinmunidad. Existen muchas patologías autoinmunes, alguna de ellas pueden afectar a todo el organismo (autoinmunidad multiorgánica o sistémica), mientras que otras afectan a órganos o localizaciones específicas del organismo (autoinmunidad específica).

Cada una de las enfermedades autoinmunes tiene sus síntomas característicos; en el caso específico de la AR se produce una sinovitis inflamatoria persistente, la cual suele afectar a las articulaciones periféricas y mantiene una distribución simétrica en la que se ven involucradas las manos, las muñecas, las rodillas, etc (7). A diferencia las EAS, se caracterizan por ser un conjunto de enfermedades inflamatorias crónicas interrelacionadas, pero heterogéneas, que comparten características clínicas, las más importantes: entesitis, compromiso del esqueleto axial: dolor espinal y glúteo, oligoartritis predominante en los miembros inferiores, tendencia a la asociación familiar, ausencia de factor reumatoide, HLA B27+ (8).

1.1. Carga económica de las enfermedades reumáticas

Las enfermedades reumáticas constituyen una causa importante de morbilidad en la población mundial, pero dado que ellas no aumentan la mortalidad a corto plazo, muchas veces no son consideradas prioridades de salud.

Los trastornos músculo-esqueléticos representan una carga tanto para los individuos como para los sistemas de salud y de asistencia social. Así, la AR es considerada por la OMS (Organización Mundial de la salud) como una de las enfermedades de mayor impacto dentro de la población debido a su incidencia, la cual aumenta notablemente con la edad generando cambios en el estilo de vida. Este hecho fue reconocido por la OMS al decretar desde el año 2000 al 2010 la década del hueso y la articulación para resaltar la importancia de las enfermedades musculo-esqueléticas (9), con el fin de ayudar a identificar las carencias y necesidades de investigación para mejorar la calidad de vida en esta población.

Costos Directos. En este tipo de enfermedades, los costos directos están relacionados con el cuidado de la salud asociados a prevención, detección, tratamiento y rehabilitación. Esto incluye visitas al médico, pruebas diagnósticas y medicamentos recetados, entre otros. Los costos directos atribuibles a la enfermedad proporcionan la estimación más clara de la aparición de la patología (10).

Costos Indirectos. Son los costos que resultan como consecuencia de una condición, tales como las limitaciones en las actividades habituales y que engloban pérdida de la producción a la sociedad. También incluye la pérdida de trabajo debido al tratamiento, licencia por enfermedad, disminución de la productividad laboral, jubilación anticipada y muerte. Así como el impedimento de obtener un empleo de mejor remuneración o la reducción de las oportunidades de empleo (10).

Costos Intangibles. Son aquellos asociados con la pérdida de la función, aumento del dolor, y la reducción de la calidad de vida de los pacientes, familiares y quienes cuidan de ellos. Los costos intangibles son difíciles de cuantificar para dar un valor monetario, sin embargo son muy importantes porque la discapacidad es un resultado significativo en las enfermedades musculo-esqueléticas que limitan las actividades de la vida diaria, e incluso el dolor crónico genera problemas psicológicos como la depresión y la ansiedad (10).

Respecto a este planteamiento, Cooper et al., en el año 2000 realizaron una revisión a través de 15 estudios en distintos países con respecto al costo de la AR y encontraron que el promedio anual por individuo en USA fue de US$5.720, mientras que en Alemania el costo por individuo con AR fue calculado para el año 2002 en €4.727, los cuales se atribuyeron a costos de tratamiento (11).

En Colombia, por su parte, los gastos para ese mismo año en los pacientes con AR, sin incluir hospitalizaciones ni gastos por cirugía fue de $2.243.082. Sin embargo, en el año 2004 se encontró que los pacientes gastaron 47% en compra de medicamentos en Colombia, cuando a nivel internacional lo máximo era del 28%; y también se planteó que aproximadamente 815 pacientes de la población estudiada disponían de un tratamiento con medicamentos biológicos que bloquean el TNF-α, pero que representaban sólo una mínima parte de los 350.000 pacientes que aproximadamente hay en toda Colombia. Los costos de la terapia de estos pacientes oscila entre 20.000 millones de pesos anuales para el estado colombiano, a través del sistema de seguridad social, lo que permite clasificar a la AR como una enfermedad que, si bien tiene costos inferiores a los trasplantes de corazón o médula ósea, es superior a la mayoría de los que generan otras enfermedades consideradas de alto costo o catastróficas, según el gobierno colombiano (12).

Posteriormente en el año 2009, Mora et al., determinaron los costos médicos directos en pacientes con AR temprana en el primer año de diagnóstico en el Hospital Militar Central de Bogotá, donde los resultados mostraron que en promedio, la atención de la enfermedad leve, moderada y grave oscilaba entre los US$ 1.689, US$ 1.805 y US$ 23.441 respectivamente, y que el 86% de estos costos eran dependientes del costo de los medicamentos, 10% de los exámenes de laboratorio y 4% de la atención médica. En resumen, el principal elemento de los costos médicos directos en la AR temprana eran los de los medicamentos y se incrementó 40 veces con el uso de la terapia biológica (13).

Con respecto a la EA en Francia, Bélgica y Países Bajos, se estimó que pacientes con la enfermedad en curso por aproximadamente 10 años tienen una media anual de costos directos de € 2.640 por paciente (14). Paralelamente, un estudio de tipo prospectivo longitudinal realizado en los Estados Unidos, donde se incluyeron 241 pacientes con EA, demostró que los costos anuales fueron en promedio de US$6.720, los costos directos se ubicaron en un 26.4% y los indirectos o de productividad en un 73.6%, lo cual explica por qué las tasas de empleo en EA están por debajo del 70%. Adicionalmente, los días de licencia anual por enfermedad para cada paciente variaban de 6 a 46 días y la incapacidad laboral era del 40%. Las tasas comparativas entre pacientes del mismo grupo etario han concluido que la discapacidad funcional severa es más alta en EA que en AR, siendo la incapacidad funcional el predictor más importante de altos costos totales. La probabilidad de tener costos totales (> US$ 10.000) aumentó en un factor de 3, con cada aumento de un punto en el índice de discapacidad del HAQ-S (en inglés, *Health Assessment Questionnaire for the Spondyloarthropathies*) en un rango de (0-3) (15).

En consecuencia, es normal que el concepto de calidad de vida, la manera como una persona o grupo de personas percibe su salud física y mental con el pasar del tiempo, se vea afectado en personas con este tipo de enfermedades. A menudo los médicos han utilizado el

concepto de calidad de vida relacionada con la salud HRQOL (en inglés, *Health-Related Quality of Life*) para medir los efectos de las enfermedades crónicas como las EAS a fin de comprender de qué manera una enfermedad interfiere en la vida cotidiana de estas personas. Actualmente, es claro que la terapia Anti-TNF-α suprime dramáticamente los síntomas en las EAS y la AR para mejorar la calidad de vida; sin embargo, los altos costos hacen que sea necesaria la cuidadosa selección del paciente que se beneficie de ella.

Por todo lo anterior, se han desarrollado tratamientos seguros que se basan en una mejor comprensión de ciertos mediadores inflamatorios como son las citocinas; estas moléculas han sido categorizadas dentro de varias clases, familias o superfamilias y su definición se dio de acuerdo al orden de descubrimiento (IL-1 a la IL-38) o por su actividad funcional, como es el caso del TNF-α. No obstante, para cualquier respuesta inmune se necesitan siempre dos tipos de señales: una que depende del contacto directo entre las células y sus respectivos receptores, así como de una segunda señal que suele ser a través de las citocinas las cuales son producidas en los primeros instantes de la activación celular. Luego que las citocinas se unen a sus receptores en la membrana de las células donde van a ejercer su función, inician una cascada de transducción intracelular de señales que alteran el patrón de expresión génica de modo que esas células diana produzcan una determinada respuesta biológica (16).

Otra de las funciones de las citocinas es regular la duración y amplitud de la respuesta inmune, tanto innata como específica, reclutar células a la zona de conflicto e inducir la generación de nuevas células a partir de los precursores hematopoyéticos. Aunque las citocinas pueden ser distintas entre sí, son sintetizadas generalmente por células del sistema inmune, son producidas de novo cuando comienza la activación celular y tienen una vida media muy limitada. Además, las citocinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica, por lo que son capaces de activar a macrófagos, eosinófilos, células NK (en inglés, *Natural Killer*) y

neutrófilos, e inducir la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por parte de los macrófagos, actuando en procesos tan importantes como la inflamación, la regulación de la expresión del CMH de clase I y de clase II. También intervienen en respuestas inmunosupresoras y son capaces de regular el cambio de isotipo de inmunoglobulinas (17).

En el caso específico del TNF-α, éste produce la activación local del endotelio vascular, la liberación de óxido nitroso con vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular, lo cual lleva al reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B; también aumenta la activación y adhesión plaquetaria. Probablemente la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene el nombre. Tanto en la AR y EAS se ha demostrado un aumento exacerbado de TNF-α, así como de otros productos a partir de los macrófagos tales como: IL 1, IL-6, IL-8 en el líquido y tejido sinovial, en correlación con la severidad de la enfermedad (7).

1.2 Generalidades del TNF-α.

El TNF-α fue nombrado así por su habilidad para destruir células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores de ratones (18). El gen que codifica a TNF-α está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 en la región 6p21 en el segmento correspondiente a la Clase III del CMH, aproximadamente a 250 kb centromérico del locus de HLA-B y 850 kb telomérico de HLA-DR. Adicionalmente, el TNF-α se encuentra en dos formas, una transmembrana (tmTNF) y una libre o soluble (sTNF) (19).

Además de lo anterior, existen dos receptores para el TNF-α, el TNFR1 de 55 KDa y el TNFR2 de 75 KDa, los cuales se expresan en células nucleadas. Adicionalmente, hay dos tipos de factor de necrosis tumoral, el TNF-α y TNF-β, ambos comparten los receptores de membrana y pueden compartir funciones o acciones celulares dependiendo del tipo celular donde se expresen los receptores. La forma extracelular del receptor del TNF-α es liberado

fisiológicamente con el propósito de modular la acción del TNF-α; es decir que el grado de inflamación articular dependerá de la concentración del receptor soluble y de la citocina (19).

Tanto la AR como la EAS son enfermedades inflamatorias sistémicas, crónicas, de curso progresivo, en cuya etiología interactúan mecanismos ambientales favorecidos por una predisposición genética. Dicho planteamiento se pone de manifiesto al establecer ciertas asociaciones entre el manejo de la terapia biológica como bloqueador del TNF-α y la influencia de ciertos SNPs (en inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*) en la región promotora, como es el caso del -308 del TNF-α.

Por esta razón algunos estudios van dirigidos a determinar la susceptibilidad a ciertas patologías basados en la presencia de ciertos SNPs. Recientemente, Song et al. realizaron un metaanálisis para establecer la asociación existente entre la presencia del SNP -308 del TNF-α y la AR. El metaanálisis reveló que no había asociación entre ellos cuando se consideraron todos los sujetos de estudio (OR: 1.129, 95% IC 0.843-1.513, p=0.416). Sin embargo, los investigadores también realizaron una estratificación por grupo étnico donde indicaron que el alelo A podría estar asociado con la AR en población Latinoamericana (OR=1.620, 95% IC 1.234-2.111, $p=3.6x10^{-5}$) pero no en europeos, árabes y población asiática. De manera que el SNP -308 del TNF-α podría representar un factor de riesgo para latinoamericanos que cursan con AR (20).

Para 1975, Carswell et al., realizaron un estudio en ratones BALB/c que habían sido tratados con líneas celulares de sarcoma Meth A y paralelamente inyectados con el suero proveniente de ratones infectados con *Bacillus calmette-guerin* (BCG), a partir de un extracto atenuado de *Mycobacterium parvum*, de tal forma que la producción de TNF fuera la más óptima. Como resultado, el TNF fue altamente sensible sobre los sarcomas de algunos ratones; y en ciertos cultivos celulares tuvo un efecto citotóxico o citostático (18). El TNF-α puede llegar a

tener repercusiones a gran escala en el organismo, como shock séptico y coagulación intravascular diseminada y en el caso específico de la AR, la sobreexpresión de TNF-α e IL-1 pueden dirigir tanto el proceso inflamatorio sistémico como el daño sinovial (21). Del mismo modo, se ha descrito una amplia gama de bioactividades para el TNF-α que incluye la activación del factor de transcripción NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (19).

Cuando el TNF-α se produce en cantidades elevadas y se vierte al torrente sanguíneo puede actuar como una hormona, es decir:

- A largo plazo puede producir caquexia caracterizada por pérdida de masa muscular y grasa, ya que induce la pérdida del apetito a nivel central e inhibe la LPL (lipoproteína lipasa), por lo que el tejido periférico no puede utilizar los ácidos grasos libres como fuente energética (22).
- En concentraciones por encima de $1x10^{-7}$ M inhibe la contractilidad miocárdica y el tono del músculo liso vascular produciendo hipotensión y pudiendo llegar al shock (23).
- Produce trombosis vascular principalmente debido a una pérdida de las propiedades anticoagulantes normales del endotelio, ya que el TNF-α estimula en las células endoteliales la expresión del factor tisular, un potente activador de la coagulación e inhibe la expresión de la trombomodulina que es un inhibidor de la coagulación. Además, posee la capacidad de causar necrosis de tumores lo cual constituye la base de su nombre y esto se debe principalmente a la trombosis de los vasos sanguíneos del tumor (24).
- También puede producir alteraciones metabólicas como aumento del tejido adiposo y resistencia a la insulina (25).
- Las células $TCD4^{+}$ activadas por algún antígeno estimulan los monocitos, macrófagos y fibroblastos sinoviales, produciéndose a partir de ellas citocinas como: IL-1, IL-6, TNF-α y

metaloproteinasas a través de la señalización que se produce a nivel de la superficie celular por el CD69 y CD11, así como de mediadores solubles tales como: el interferón-γ e IL-17. En síntesis, la IL1, IL-6 y TNF-α son las principales citocinas involucradas en el proceso de inflamación en la AR (7).

Además actúa en la patogénesis de la EA y otras formas de EAS y el aumento en la expresión de TNF-α ha sido reportado en células de las articulaciones sacroilíacas de los pacientes afectados (26). Incluso la anquilosis axial y entesopatías parecidas a la EA humana desarrollada en ratones transgénicos, reflejan un aumento de la expresión de TNF-α (27).

Cabe comparar adicionalmente que el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma, pero que las diferencias encontradas entre ellos, es decir sus diferencias fenotípicas y/o de susceptibilidad a ciertas enfermedades, radica en el 0.1%(28). En este contexto, se ha definido que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades se encuentra principalmente en los SNPs, y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva; por el contrario, el ADN está expuesto a un sin número de variaciones asociadas con la diversidad de la población, la individualidad, la susceptibilidad a enfermedades y una respuesta diferencial al tratamiento, dependiendo de la condición clínica (29).

Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente. La base pública de SNPs (dbSNP) hasta la fecha ha catalogado más de 9 millones de variantes génicas y en el caso específico del gen *tnf,* la mayor parte se encuentra en la región promotora, donde el primero en ser referenciado fue el SNP en la posición -308 del gen *tnf-α*. Aunque la literatura describe otros SNPs presentes en el gen, tales como: -1031 T/C, -863 C/A, -

857 C/T o +1304 G/A. Al respecto los SNPs pueden influenciar la actividad promotora o de conformación del ADN y pre-mRNA, lo cual tiene un rol directo en la expresión fenotípica (30).

1.3 Tratamiento clásico de la AR y las EAS

El tipo de tratamiento en estas enfermedades ha variado en el tiempo y su rol central es poder disminuir la actividad inflamatoria al máximo, para así evitar la progresión de la lesión articular. Sin embargo, las consecuencias del tratamiento con estos fármacos en sujetos diagnosticados con AR o EAS son variables e impredecibles. Una posible causa para explicar las diferencias tanto en la eficacia como en la aparición de reacciones adversas podrían ser las variaciones genéticas que presenta cada individuo.

Aun cuando la actividad de un fármaco puede ser evaluada a través de parámetros clínicos y analíticos, normalmente se consideran los criterios de mejoría según lo que contemple el colegio americano de reumatología, por lo que en la práctica clínica se toma en cuenta el índice DAS28 el cual se ha consolidado como una variable fundamental para valorar la actividad de la AR y de esta forma establecer las decisiones terapéuticas incluyendo el inicio y el cambio de tratamiento biológico cuando corresponda. Por otro lado, en la EA el índice BASDAI (en inglés, *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity*) se utiliza actualmente como criterio de respuesta por el grupo ASAS (en inglés, *Assesment of Spondyloarthritis*) para evaluar la respuesta a tratamientos biológicos.

En cuanto al tratamiento inicial en la AR, éste corresponde al uso de medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad DMARD (en inglés, *Disease-modifying antirheumatic drugs*), los cuales son capaces de reducir la sinovitis. Sin embargo, la monoterapia con estos medicamentos a menudo no logra controlar la AR por lo que algunos pacientes requieren de la combinación de más de un DMARD, lo cual podría ser una alternativa razonable

(31). Paralelamente, en la EA el tratamiento inicial corresponde a los antiinflamatorios no esteroideos AINES y terapia física (32).

La búsqueda de soluciones a este tipo de enfermedades ha generado un amplio interés en el ámbito científico, por lo que actualmente existen nueve fármacos biológicos diferentes, siete de los cuales corresponden a inhibidores de citocinas pro-inflamatorias (cinco dirigidos al TNF, uno a la IL-1 y otro a la IL-6). Todos estos fármacos tienen perfiles de eficacia más o menos similares y están aprobados como terapia de primera o de segunda línea en pacientes que no han respondido a los fármacos convencionales (33). A pesar de los irrefutables beneficios clínicos y radiológicos de las terapias biológicas, todavía existen tasas bajas en pacientes que logran la remisión estable y en consecuencia, la búsqueda de nuevas estrategias biológicas continúa.

En definitiva, el uso óptimo del tratamiento y las variaciones en la respuesta al mismo sencillamente suponen la existencia de mecanismos de regulación génica como los polimorfismos detectados en el TNF-α que podrían estar involucrados en la adaptación del medicamento. Por consiguiente, la farmacogenética es un área que promete aplicar o desarrollar tratamientos adaptados al perfil genético de la persona (34).

1.3.1 Generalidades de fármacos biológicos

En la última década ha surgido un profundo interés por la comprensión a nivel molecular de los eventos biológicos que se llevan a cabo en el tejido sinovial, lo cual ha generado la implementación de bases terapéuticas para el tratamiento de patologías tan complejas como son las enfermedades autoinmunes. En este contexto, los fármacos anti-TNF-α han mostrado una capacidad de bloqueo a la progresión del daño anatómico en el que la terapia convencional no había mostrado eficacia.

Las dianas terapéuticas involucradas en el proceso de bloqueo pueden ser: una línea celular (células B, células T u otras células inmunocompetentes), 2) mediadores inflamatorios

solubles como citocinas, moléculas de la vía del complemento, enzimas e inmunoglobulinas y 3) receptores de superficie de estos mediadores. Lo anteriormente expuesto ha servido como base para la llegada de agentes biológicos que bloquean el efecto de ciertas citocinas pro-inflamatorias como es el caso del TNF-α y la IL-1; estos productos biológicos fueron desarrollados en la década de los 70 y 80 del siglo pasado. Generalmente son compuestos producidos por células vivas mediante la tecnología del ADN recombinante y en este grupo se encuentran los anticuerpos monoclonales, los cuales pueden ser quiméricos (por ejemplo: Infliximab y Etanercept) o humanizados (por ejemplo: Adalimumab) (35).

En el 2011 se hizo una revisión respecto a las denominaciones comunes internacionales para los agentes biológicos (en inglés, *International Non propietary Names for the biological and biotechnological substances*) por la OMS, tabla 1:

Blanco	Origen	Tipo de Molécula
L(i): Sistema Inmune	U. Humano Total	Mab. Anticuerpo Monoclonal.
S(o): Hueso	O:Ratón	Cept: Proteína de Fusión
T(u): Tumor.	A:Rata	Kinra: Antagonista del receptor de intercina.
K (i): Interleucina.	Zu: Humanizado	Kinra: Antagonista del receptor de intercina.
C(i): Cardiovascular.	E: Hamster	Kinra: Sustancia tipo interleucina.
F(u): Hongos	I: Primate	
V(i): Virus	Xi: Quimérico (murino-humano)	-
B(a): Bacteria	Axo: Rata/Ratón.	-
Tox(a): Toxina	Xizu: Combinación de cadenas humanizadas quiméricas	

Tabla 1. Nomenclatura de los Agentes Biológicos

1.3.1.1 Clasificación de los fármacos anti- TNF-α.

En 1975, Georges Köhler y Cesar Milstein describieron un método que consistía en la generación de una línea celular estable capaz de secretar un isotipo determinado de

inmunoglobulina contra un antígeno específico, producto de la fusión de dos células diferentes por medios físicos y químicos. De esta unión surgió un tipo de célula inmortal con la capacidad ilimitada de producción de anticuerpos monoclonales, llamada hibridoma. Sin embargo, desde que se introdujo el primer anticuerpo monoclonal con esta tecnología para uso clínico, se observó que estos anticuerpos monoclonales, por ser de origen murino, generaban intensas respuestas de hiperreactividad (36), razón por la cual se desarrollaron anticuerpos quiméricos humanos a partir de ratones con la tecnología del ADN recombinante, en la cual los genes que codifican la región variable de las inmunoglobulinas de ratón se unen con genes que codifican la región constante humana, para posteriormente ser insertadas en células de mieloma.

En la década de 1980, los anticuerpos humanos con dominios variables murinos, sufrieron una reducción importante en cuanto a su aplicación debido a la respuesta humoral de anticuerpos humanos anti-ratón HAMA (en inglés, *Human Anti-Mouse Antibody reaction*), debido a lo cual se empezaron las mejoras en la producción de anticuerpos monoclonales que solo poseían de origen murino las regiones determinantes de la complementariedad CDR (en inglés, *Complementarity Determining Region*) (37). Así, estos anticuerpos monoclonales quiméricos fueron menos inmunogénicos, aunque se ha observado respuesta anticuerpo-anti-quimérico en productos usados en humanos.

Sin embargo, grupos de investigación han tratado de desarrollar anticuerpos monoclonales humanizados capaces de minimizar la inmunogenicidad, gracias a las bibliotecas de bacteriófagos con genes que codifican las regiones variables de las inmunoglobulinas. Es así como desde 1997 se han autorizado varios anticuerpos quiméricos y humanizados como productos terapéuticos (38).

Nombre	Objetivo	Definición	Mecanismo	Administración
Etanercept	TNF-α	Proteína de Fusión Humana recombinante del receptor TNF y la porción Fc de la IgG1.	Funciona como un receptor señuelo. Se une al TNF soluble, bloqueando la unión a su receptor.	Inyección subcutánea. una vez semanal (50 mg), o dos veces en una semana (25 mg).
Adalimumab	TNF-α	MAb completamente humanizado IgG1.	Se une al TNF.	Inyección subcutánea. Una vez cada dos semanas.
Infliximab	TNF-α	MAb quimerico de la IgG1.	Se une al TNF soluble y de membrana.	Inyección intravenosa. Una infusión cada 4-8 semanas.
Golimumab	TNF	MAb completamente humanizado IgG1.	Se une al TNF soluble y de membrana.	Inyección subcutánea. Una vez cada mes o intravenosa. Infusión a las 0-4 semana.
Certolizumal-pegol	TNF	Fragmento Fab humanizado, unido a dos moléculas de polietilenglicol	Se une al TNF.	Una vez cada dos semanas.

MAb: Anticuerpo monoclonal; IgG: Inmunoglobulina G.
Tabla 2.Fármacos Biológicos Anti-TNF disponibles para el tratamiento.

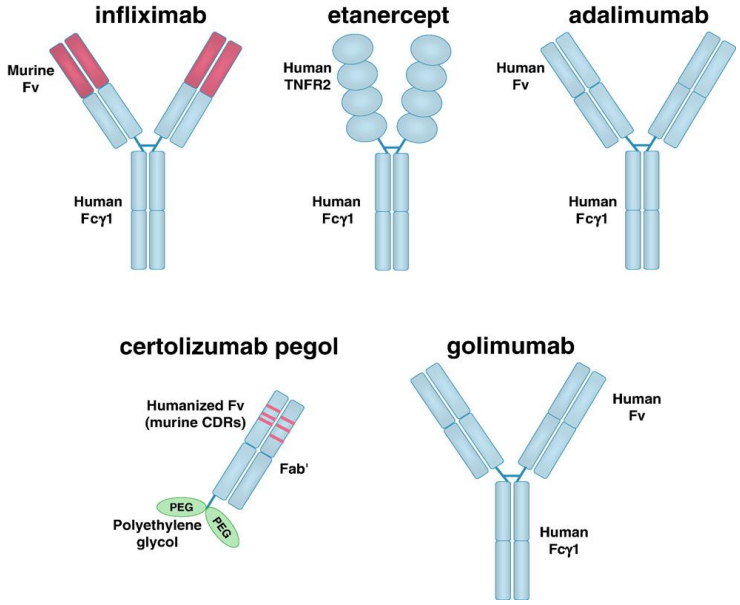


Figura 1. Diagrama simplificado de 5 antagonistas del TNF-α.
Infliximab (Anticuerpo anti-TNF monoclonal Quimérico de Isotipo IgG1), Adalimumab y Golimumab (Anticuerpos Anti-TNF monoclonal IgG1, completamente humanizado), Etanercept (Proteína de fusión de TNFR2 y la región Fc de la IgG1 humana), Certolizumab (Fragmento Fab' pegylado del anticuerpo anti-TNF monoclonal IgG1 humanizado), tomado de (21).

1.3.1.1.1 Aspectos generales del Adalimumab

El Adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG1, diseñado gracias a la manipulación del genoma de los fagos (en inglés, *phage display*) (39), capaz de unirse tanto al TNF que se encuentra en circulación como al TNF que se encuentra en las superficies celulares.

En 2007, Van der Heijde realizó un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo en pacientes con EA activa con el fin de evaluar la reducción de signos y síntomas. Los resultados finales mostraron que los pacientes que recibieron Adalimumab tuvieron mejoras significativas, ya que se observó una reducción en la actividad de la enfermedad incluso durante la semana 24 del tratamiento. Aunque los pacientes tratados con Adalimumab reportaron más eventos adversos en comparación con los pacientes que recibieron placebo, los resultados no fueron estadísticamente significativos(40).

Posteriormente en el año 2010, un planteamiento a cargo del investigador Bartelds et al, demostró que el desarrollo de ADAs (en inglés: *Anti-drug-antibodies*) trae como consecuencia el fracaso al tratamiento, a través de un estudio de cohorte prospectivo en 272 pacientes con AR que recibieron Adalimumab. Después de 3 años, 76 de los 272 pacientes desarrollaron ADAs, y este comportamiento también fue observado en 51 pacientes, incluso durante las primeras 28 semanas de tratamiento. Por otro lado, aquellos que no desarrollaron ADAs tenían una concentración más alta del fármaco en comparación con aquellos que presentaban títulos de anticuerpos anti-Adalimumab (41). Estas asociaciones plantean interrogantes sobre cuáles parámetros podrían estar influenciando la formación de anticuerpos anti-fármaco o si existe alguna variante genética como el SPN -308 del TNF-α que pudiera estar asociada.

1.3.1.1.2 Aspectos generales del Infliximab

El Infliximab es un anticuerpo monoclonal (cA2) que se compone de una región constante humana y de otras variables de ratón; se une con gran afinidad al TNF humano anulando sus

acciones biológicas. Este medicamento se introdujo en el mercado desde 1998 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y posteriormente se usó para otras patologías(42).

El anticuerpo anti-TNF quimérico A2 (CA2) o Infliximab, se desarrolló al ser vinculados los genes de la región constante de la IgG1 humana, específicamente de la cadena kappa con las regiones variables de unión al antígeno clonado a partir de un Mab murino anti-TNF-α (42).

La generación del hibridoma anti-TNF-α murino original se realizó mediante la inmunización de ratones BALB/c con TNF-α recombinante humano purificado. Posteriormente la línea celular del hibridoma A2 se utilizó para la preparación de las bibliotecas genómicas que luego permitieran el aislamiento de los genes que codificarían los dominios de unión a antígeno, es decir la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de la región variable (42).

Algunas investigaciones han tratado de mostrar el valor pronóstico de algunos polimorfismos del TNF-α en pacientes tratados con Infliximab. Es por ello que Balog et al., a través de un estudio en pacientes con AR y enfermedad de Crohn plantean la efectividad de Infliximab con base en polimorfismos en el gen *tnf-α* y la apoptosis en células mononucleares de sangre periférica. Ellos analizaron los genotipos por PCR-RFLP, la producción de TNF-α *in vitro* por citometría de flujo y la viabilidad por isotiocianato de fluoresceína. El resultado fue que 8 de los 12 pacientes no respondedores eran portadores del alelo A asociado con alta producción de TNF-α. Además, los resultados de viabilidad exponen que el 44.2% de las células tratadas con Infliximab entraron en apoptosis a las 48 horas. Por lo cual proponen la determinación de polimorfismos del TNF como una opción para identificar candidatos adecuados para el tratamiento (43).

1.3.1.1.3 Aspectos generales del Etanercept

El Etanercept es una proteína de fusión dimérica que consiste en dos dominios extracelulares del receptor p75 (sTNFRII), ligado a la porción Fc de una inmunoglobulina

humana tipo 1 (IgG1), la cual ayuda a retener la molécula de TNF en circulación. Por inhibición competitiva, los dos brazos del sTNFRII se unen a dos de los tres sitios de unión sobre el trímero de TNF, impidiendo la unión del TNF al receptor que está en la superficie celular (44).

Van der Heijde, a través de un estudio doble ciego controlado por placebo, comparó la eficacia, farmacocinética y seguridad del Etanercept al ser administrado (50mg. una vez por semana, 25mg. dos veces por semana y placebo) en 356 pacientes con EA. Los resultados proponen una mejora significativa en ambos planes de administración del medicamento (45).

1.3.2 Inmunogenicidad de los fármacos anti- TNF-α.

En muchos casos las enfermedades autoinmunes, en especial la AR y las EAS, pueden tener un comportamiento refractario frente al tratamiento convencional, aunque los anticuerpos monoclonales mantienen la promesa de mejorar esta condición.

Sin embargo, la administración repetida de proteínas terapéuticas o recombinantes a menudo conduce a la inducción de ADAs, los cuales son capaces de interferir o neutralizar el efecto del fármaco. Naturalmente una respuesta inmune a proteínas extrañas se puede esperar y se entiende bien, pero la base para el desarrollo de respuestas a las proteínas autólogas terapéuticas es el tema de debate, ya que algunos pacientes pueden persistir en la enfermedad activa, tener reacciones a la infusión e incluso tener recaídas frente a la terapia biológica que estén recibiendo (46).

La palabra inmunogenicidad puede ser definida como un beneficio de nuestro sistema inmune, ya que es la capacidad que pueden tener diferentes sustancias en desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa de tipo celular y humoral que a largo plazo constituye la memoria inmunológica.

Pero la inducción de anticuerpos contra el fármaco anti-TNF-α dependerá principalmente de su constitución; por lo tanto, los medicamentos quiméricos tendrían una mayor capacidad de inducir inmunogenicidad en comparación a fármacos completamente humanos (47).

En la actualidad se han identificado tres tipos de anticuerpos contra fármacos anti-TNF:

- HAMA: por su sigla en inglés, *Human Anti Mouse Antibodies*, son anticuerpos dirigidos contra anticuerpos monoclonales de origen 100% murino. No se utilizan en la clínica, pero en estudios experimentales se ha demostrado la producción de estos anticuerpos en el 90% de los sujetos expuestos a este tipo de molécula.
- HACA: por su sigla en inglés, *Human Anti Chimeric Antibodies*, son los dirigidos contra moléculas quiméricas como el Infliximab.
- HAHA: por su sigla en inglés, *Human Anti Human Antibodies*, dirigidos como su nombre lo indica contra anticuerpos monoclonales humanizados como el Golimumab y el Adalimumab.

1.3.2.1 Mecanismos inmunológicos que pueden intervenir en el desarrollo de ADAs.

Algunos de los eventos que están involucrados en la activación de células B y que pueden generar la producción de anticuerpos podrían ser: uno dependiente de células T (Td) y otro que es independiente de la activación de las células T (Ti). La activación Ti ocurre cuando la característica estructural de alguna molécula, tales como repeticiones poliméricas inducen ciertas "señales" requeridas para estimular la activación de células B. Por otro lado; el componente c3d en la vía del complemento tiene una participación importante cuando la respuesta inmune Td no puede activarse, lo que lleva al desarrollo de memoria inmune (46).

Si bien es cierto, la activación Ti es frecuentemente citada como la fuente de anticuerpos a proteínas terapéuticas, habitualmente no se produce maduración o la generación de células B de memoria. Mientras que la activación Td de las células B resulta en una respuesta de anticuerpos

mucho más robusta, cambio de isotipo y el desarrollo de células B de memoria. Por esta razón se estima que la activación Td estaría involucrada en respuesta a proteínas terapéuticas ya que la respuesta Td requiere el reconocimiento por parte de las células T de epítopes contenidos en la proteína que constituye el fármaco, es decir al péptido del epitope (derivado del procesamiento interno por parte de las células presentadora de antígeno) por medio del CMH II (46).

Al respecto, la tolerancia a proteínas propias es una característica básica del sistema inmunológico; sin embargo, el desarrollo de ADAs a proteínas recombinantes autólogas podría ser considerado como un incumplimiento de la tolerancia. Es importante considerar la existencia de ciertos vínculos entre algunas enfermedades autoinmunes y el desarrollo de inmunogenicidad a proteínas terapéuticas (46).

	Respuesta Inmune frente a antígenos exógenos clásicos	**Respuesta inmune a proteínas recombinantes autólogas (terapéuticos)**
Anticuerpos	Presente	Podría ser inducida si la proteína esta alterada, lo que permite ser reconocidas por los receptores de células B (IgM, IgG)
Respuesta de células T	Presente	Podría estar presente en algunas circunstancias
Células T reguladoras	Ausente	Podría controlar la respuesta de autoantigenos
Inflamación	No se produce en algunos casos.	Probablemente contribuye a la participación de células T reguladoras y posteriormente a inmunogenicidad.
Adyuvantes	Aumento de la probabilidad de inmunogenicidad por estimulación de la respuesta inmune innata.	Probablemente se produce un quebrantamiento de la tolerancia
Carácter Habitual de la Respuesta Inmune	Respuesta inmune inflamatoria o efectora	Tolerancia

Tabla 3. Diferencias y relaciones entre las respuestas inmunes frente a antígenos exógenos clásicos y proteínas autólogas (terapéuticos).

Con respecto a esta tabla, se podría indagar que estos dos mecanismos ligeramente diferentes, pero estrechamente vinculados en el desarrollo de inmunogenicidad en respuesta a la utilización de proteínas terapéuticas, podría darse por medio de una respuesta inmune clásica a proteínas extrañas y/o por tolerancia incompleta a proteínas autólogas. En este sentido, se torna necesario el hecho de poder definir métodos que proporcionen datos fiables y reproducibles. Las técnicas actualmente disponibles son el inmunoensayo (ELISA) y la radioinmunoprecipitación (RIA), aunque en Colombia no se encuentran disponibles para su uso comercial y los datos que se tienen sobre su uso son derivados de estudios realizados en otros países.

A nivel de laboratorio, las concentraciones de anti-TNF y de ADAs pueden ser inversamente proporcional; es decir, cuando existe un aumento en la concentración de ADAs se hace difícil la detección del medicamento y viceversa, por ello se hace necesario definir el tiempo de administración y la dosis del mismo.

Aunque algunos estudios evidencian que la prevalencia de HACA por ELISA en pacientes con AR se ubica entre un 17.4% y un 44% para anti-TNF-α y en un rango del 15% al 30% en pacientes con EA, se ha especulado que la presencia de HACA podría explicar los casos de fallo terapéutico aunque no todos los pacientes no respondedores presentan HACA, lo que sugiere que otros factores podrían estar implicados en ese fallo terapéutico (48).

1.3.2.2 Otros factores asociados a inmunogenicidad

En general, se reconoce que la inmunogenicidad de los anticuerpos humanizados es menor a la de los quiméricos, se han demostrado dos mecanismos principales mediante los cuales se producen estos anticuerpos, unos intrínsecos que hacen referencia a la estructura del medicamento y otros extrínsecos secundarios a otros factores ajenos al medicamento (49).

A. Mecanismos Intrínsecos:

- Presencia de alotipos e idiotipos en la molécula del fármaco que, aunque sean de origen humano, son diferentes a los que expresa el huésped y no hacen parte de su repertorio antigénico. Por lo tanto, durante la maduración de los linfocitos T no fueron presentados en el timo, haciendo que sean reconocidos como extraños y generen inmunogenicidad.
- Modificaciones estructurales en la molécula del fármaco como la agregación o empaquetamiento de los anticuerpos durante su producción, generando neoepítopes y antigenicidad.
- Modificaciones post transcripcionales en la molécula proteica del medicamento como la glicosilación, generando producción de anticuerpos.
- Durante el almacenamiento o reconstitución del fármaco puede haber generación de productos de degradación de éste, bien sea por alteraciones propias de la forma farmacéutica o errores en su manipulación, siendo estos productos inmunogénicos.
- Los anticuerpos dirigidos contra proteínas de membrana en general son más inmunogénicos que los dirigidos contra proteínas solubles, ya que producen destrucción de sus blancos celulares al generar productos que inducen producción de anticuerpos, en cuyo caso se trata de un mecanismo teórico que no se ha demostrado en la clínica.

B. Mecanismos extrínsecos:

- Las vías de administración parenterales intramuscular o subcutánea son más inmunogénicas que la endovenosa, esto porque en la piel y el tejido celular subcutáneo hay más contacto con vasos linfáticos y células dendríticas que llevan la proteína directamente a los ganglios linfáticos facilitando así su poder inmunogénico.

- Hay más inmunogenicidad cuando el paciente cursa con activación del sistema inmune, bien sea por infecciones activas o enfermedades autoinmunes activas.
- Desde el punto de vista genético, hay subtipos de HLA del paciente que pueden facilitar la inmunogenicidad de los fármacos biológicos dado que existen secuencias de aminoácidos que se conocen como "secuencias motivos promiscuas" que pueden estar presentes en la estructura primaria del medicamento. Estos son reconocidos por varios subtipos de HLA presentes en diferentes poblaciones, haciendo que si el anticuerpo monoclonal contiene estos motivos en su estructura, se pueda generar más inmunogenicidad que si no los tuviera.
- Algunos investigadores proponen que la dosis y la cantidad total de un medicamento estarían relacionadas con inmunogenicidad. Sin embargo, para algunos investigadores el efecto de la duración del tratamiento sobre la inmunogenicidad parece ser un factor que es independiente de las cantidades suministradas (50). Aunque un estudio demostró que un alto porcentaje de pacientes con AR (73%) necesitan de un incremento en la dosis de Infliximab para obtener una respuesta apropiada (51), en contra parte un estudio aleatorizado multicéntrico-controlado con placebo en 101 individuos con AR que recibieron Infliximab en dosis de 1, 3, 10 mg/kg, demostró la presencia de HACAS en 53%, 21% y 7%, respectivamente (52).

1.3.2.3 Métodos para detectar ADAs contra fármacos anti- TNF-α

Un aspecto importante al considerar la utilización de ciertas estrategias es la capacidad del ensayo para medir con precisión y fiabilidad no solo los niveles de ADAs sino también del fármaco activo. Por ejemplo, la detección de ADAs se ve obstaculizada por el hecho de que la mayoría de los antagonistas del TNF son inmunoglobulinas y por la complejidad de medir anticuerpos contra anticuerpos; verbigracia la especificidad para medir ciertas inmunoglobulinas

como la IgG4 que es una molécula biespecífica y dinámica debido a su capacidad de intercambio del fragmento Fab de una cadena ligera y una cadena pesada adjuntas (53).

Además, está inmunoglobulina representa el 5% del total de IgG sérica en adultos normales y puede representar más del 80% del total de la IgG después de una exposición crónica a un antígeno (54). Paralelamente, la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas puede inducir dos clases de respuestas inmune-humoral; una basada en la producción de anticuerpos no neutralizantes NNAbs (en inglés, *Non-neutralizing antibodies*), cuyas inmunoglobulinas son capaces de unirse a sitios antigénicos en las proteínas terapéuticas sin afectar sus funciones normales. Sin embargo, pueden formar complejos inmunes que son absorbidos rápidamente por el sistema retículo endotelial, reduciendo así la biodisponibilidad de las proteínas terapéuticas administradas. Por el contrario, la presencia de anticuerpos neutralizantes NAbs (en inglés, *Neutralizing antibodies*) genera consecuencias clínicas negativas ya que neutralizan las proteínas terapéuticas y por lo tanto, reducen su eficacia (55). Por esto es importante considerar la utilización de ciertas estrategias para medir con precisión y fiabilidad no solo los niveles de ADAs, sino también del fármaco activo.

A. ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas):

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. La aparición de color permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Existen dos tipos de ELISA usados para la detección de ADAs (56):

- **ELISA de Captura**: La cadena ligera λ perteneciente a ADAs, se une al antagonista del TNF-α, capturado por unión directa a la placa cubierta con TNF-α. Los ADAs son detectados por anticuerpos anti humano de cadena ligera λ marcados con una enzima. De forma alternativa, también se puede realizar una captura de ADAs a través de la unión del fragmento Fab del

fármaco que recubre la placa y usando posteriormente un anticuerpo anti humano Fcγ unido a una enzima(56).

Sin embargo, es posible que las pruebas fallen en la detección de ADAs anti idiopáticos o también por alta sensibilidad al fármaco, es decir generándose uniones de ADAs por ambos fragmentos Fab al fármaco en el suero evitando que pueda llegar a unirse al fármaco fijado en la placa, generando así falsos negativos (56).

- **ELISA puente** (en inglés, *Bridging* ELISA)**:**Esta técnica depende en primera instancia de la bivalencia de anticuerpos IgG y multivalencia de anticuerpos IgA e IgM, así como de la habilidad de estas inmunoglobulinas de unirse como un "puente" al fármaco biológico que se encuentre preinmovilizado y adicionalmente con una molécula del fármaco que está marcado con la enzima. No obstante, esta técnica también puede presentar falsos positivos por uniones cruzadas entre el fragmento Fc perteneciente al fármaco biológico y el factor reumatoide presente en el suero y/o anticuerpos antialotipo, o también por componentes del complemento activado en suero de pacientes con alta actividad inflamatoria. En contraste, la presencia de falsos negativos está dada por la alta sensibilidad de los ADAs a los fármacos o por la falla en la detección de ADA IgG4 los cuales predominan en periodos prolongados de inmunización, figura 2(56).

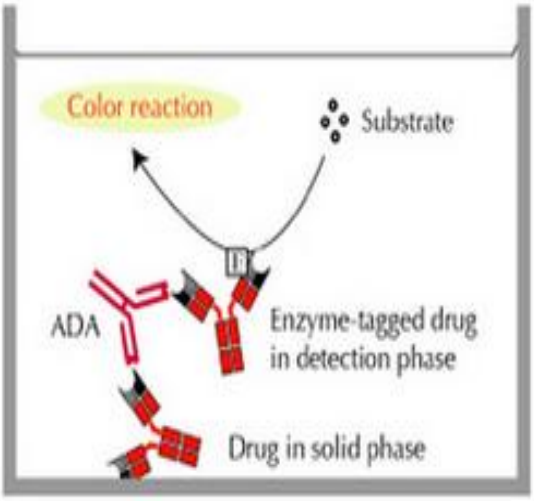


Figura 2. ELISA puente (en inglés, *Bridging ELISA*), tomado de (56)**.**

B. RIA(en inglés, *Fluid-Phase Radio Immuno Assay*)

Esta técnica detecta grandes cantidades de ADAs, ya que revela todos los isotipos y subclases de inmunoglobulinas unidas al fármaco, incluyendo la IgG4. Esté RIA tiene lugar en fase fluida y se asemeja a las condiciones in vivo mejor que los ELISA. Además, no se ven influenciados por los posibles artefactos encontrados en ensayos en fase sólida. Las limitaciones de RIA incluyen la necesidad de instalaciones avanzadas de laboratorio, la falta de detección de ADAs unidos a la droga en sí; aunque la mayor desventaja de la técnica es no discriminar entre los ADAs no neutralizantes y neutralizantes(56).

C. HMSA(en inglés, *Homogeneous Mobility-Shift Assay*)

Es una técnica costosa como para ser usada en rutina, cuyo potencial clínico aún sigue en estudio, que utiliza la cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño para determinar las concentraciones de ADAs (56).

D. RGA(en inglés, *Reporter Gene Assay*)

Es un método que permite medir la funcionalidad tanto del fármaco como de los ADAs, es decir el efecto inhibitorio del biológico con respecto al TNF y de ADAs como neutralizante. Este método se lleva a cabo en una sola etapa en la que se añade el suero del paciente al cultivo celular, entonces el inhibidor del TNF-α disponible interactúa con los receptores específicos en la superficie celular para generar una salida de luminiscencia (56).

1.4 Espondiloartropatias

1.4.1 Definición

El término Espondiloartritis también conocido como Espondiloartropatía (EAS) abarca un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias que se caracterizan por oligoartritis a nivel periférico, inflamación de las inserciones de los ligamentos y de los tendones a los huesos

(Entesitis), aunque puede presentar manifestaciones mucocutáneas, oculares, cardíacas y se ha visto asociado con HLA-B27(57).

Los subtipos de EAS son: Espondilitis Anquilosante (EA), Artritis Reactiva (ARe), Artritis Psoriásica (PsA), Artritis Enteropática (Asociada con enfermedad Inflamatoria Intestinal y colitis ulcerativa o Enfermedad de Crohn's), Espondiloartritis juvenil; Espondiloartritis indiferenciada (EASI)(58).

La prevalencia dentro de las EAS se ubica entre el 0.1% y 2.5% aunque las cifras varían de una población a otra, mientras que el rango de incidencia reportado oscila entre 0.3 a 7.3 por cada 100.000 habitantes por año. Dentro de las EAS, se destaca la EA como el subtipo más frecuente dentro de las EAS seronegativas en algunas zonas del mundo cuyo inicio se determina entre los 20 y los 30 años de edad, aunque son los factores genéticos los que determinan primariamente el riesgo y la severidad de la enfermedad se contrasta a través de estudios radiológicos, BASDAI o BASFI (59).

Un estudio realizado por Valle et al. (2011) puso de manifiesto la ausencia de datos demográficos, de incidencia y de prevalencia en pacientes con EAS en Colombia (60), pero se ha reportado una reducción en la calidad de vida de aquellos pacientes con menor nivel educativo con este tipo de enfermedades (61).

1.4.2 Diagnóstico de las EAS

Criterios diagnósticos en EAS del grupo ASAS (en inglés, *Ankylosing Spondilytis Assesment Study*), son los siguientes (62):

Diagnóstico radiológico de sacroileítis +1 o más características de espondiloartritis.	**HLA B27 + 2 o más características de espondiloartritis.**
Características de espondiloartritis	Diagnóstico radiológico de sacroileítis
• Dolor inflamatorio bajo. • Artritis. • Estesitis • Uveitis. • Dactilitis. • Psoriasis. • Crohn/Colitis. • Buena respuesta a Aine. • Historia familiar de EAS. • HLA-B27. • Proteína C reactiva, elevada.	Inflamación activa (aguda) en RM altamente sugestiva de sacroileítis asociada a EAS. Sacroileítis radiológica definida acorde con los criterios de Nueva York (grado >2 bilateral o grado 3-4 unilateral).

Tabla 4. Criterios de Clasificación ASAS para espondiloartritis.

1.4.3 Etiología de las EAS

Por otro lado, en el año de 1971, el investigador John Ball proporcionó una primera descripción histológica de la EA distinguible de la AR, en la que expuso la destrucción inicial a nivel de la entesis (el sitio de inserción de ligamentos, tendones y cápsulas articulares al hueso). Además, propuso la presencia de "sindesmofitos" cuyo término define la calcificación de los ligamentos de la articulación (63). Posteriormente se reportó la fuerte asociación genética entre las EAS y el HLA-B27, cuyo alelo es poseído por el 90% al 95% de los pacientes con EAS(64). Luego en 1995 Braun et al. realizaron un estudio de biopsias de tejidos articulares a partir de pacientes con EA y evidenciaron por técnicas de hibridación e inmunohistoquímica la presencia de niveles elevados de TNF-α (26). Sobre la base de las ideas expuestas se inició la búsqueda de características diferenciales entre las EA y la AR, por lo que se reportó un alto número de macrófagos regulatorios M2, cuyo marcador es la proteína $CD163^{+}$ restringida a la expresión del

linaje monocítico/macrófago en la EA, mientras que en el caso de la AR se planteó la presencia de macrófagos pro-inflamatorios M1 (65).

Sin embargo, hoy en día no se sabe a ciencia cierta cuál es la causa exacta de las EAS. La comunidad médico-científica resalta que la mayoría de las personas que sufren la enfermedad presentan en sus familias otros casos de EAS, por lo que se piensa que se trata de una enfermedad con un factor hereditario alto; mientras que otras apreciaciones revelan el papel fundamental que juega el antígeno de histocompatibilidad HLA-B27, ya que esta molécula es capaz de acoplar un péptido en su interior que permite la posterior activación del linfocito T y la posibilidad de presentar este antígeno supone la probabilidad del 1-2% de padecer de EA (66).

Del mismo modo, se ha demostrado una tendencia de HLA-B27 a plegarse erróneamente formando homodímeros y formas no canónicas que podrían acumularse en el retículo endoplasmático (RE) e inducirían respuestas a estrés, desencadenando procesos inflamatorios que podrían tener un papel patogénico en el desarrollo de la EA. El plegamiento anómalo podría inducir la activación de NF-κB y éste, a su vez, induciría producción de citocinas proinflamatorias tales como el TNF-α, IL-1 o IL-6, en monocitos-macrófagos (67).

1.4.4 Factores genéticos relacionados a las EAS

Aunque la etiología precisa de las EAS es desconocida, existe una creciente evidencia de que estas enfermedades son el resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales e inmunológicos.

Desde hace tiempo, se sabe que las EAS se pueden presentar en parientes de primer grado y se presume la asociación existente entre factores genéticos compartidos; sin embargo, fue hasta la década de 1970 cuando se asoció el alelo HLA-B27 con la enfermedad (68).

En el año 2013, la organización IGASC (en inglés, *International Genetic of Ankylosing Spondylitis Consortium*), demostró la presencia de múltiples variantes de riesgo asociados a la

EA identificando 13 loci adicionales, lo cual generó un aumento en el número total de marcadores genéticos asociadas con la EA. Por lo tanto, la presencia de estos loci refuerzan la creciente evidencia de que el procesamiento de péptidos aberrantes antes de la presentación del CMH de clase I ocurre y que alteraciones producidas en la vía de la IL-23 son elementos claves en la patogénesis de la EA; por lo que las asociaciones a la región del CMH no están totalmente definidas exclusivamente por el alelo HLA-B27 (69).

Tal es el caso del incremento de la frecuencia del alelo HLA-B60 y HLA-B39, los cuales se han asociado a la susceptibilidad a desarrollar EA independientemente del alelo B27 en pacientes de China y Japón, respectivamente (70, 71). Por otro lado, la puesta en práctica de estudios de asociación de genoma completo o GWAS ha sido una herramienta importante para identificar variantes genéticas asociadas a ciertas patologías. En lo que respecta a las EAS, se han establecido éstas como un grupo de enfermedades multifactoriales con una base poligénica, en la que están involucrados genes tanto de adentro como de afuera del complejo mayor de histocompatibilidad, y además de la región HLA unos 30 loci de riesgo no-HLA han sido descritos, estudio en el cual se incluyeron sujetos provenientes de Colombia (72, 73), ver anexo1.

1.4.5 Citocinas involucradas en el proceso inflamatorio de las EAS.

Generalmente los macrófagos M2 están en pacientes con EAS, estas células tienen propiedades inmunoreguladoras y están involucradas en el proceso de angiogenesis, así como en la reparación de tejidos. Por otro lado, la inducción de este tipo de macrófagos se debe a estímulos por parte de la IL-4, IL-10 y la coestimulación por parte de complejos inmunes, así como ligandos de TLRs. Estudios sobre fluido sinovial soportan la idea de que cambios en el balance M1/M2 podrían influenciar variaciones en ciertas citocinas pro inflamatorias, de hecho el TNF, IL-1, IL 12p40 secretadas por macrófagos M1 se encuentran disminuidos en pacientes con EAS comparados con pacientes con AR. En contraste, la IL-23 ha sido asociada con el control de

células linfoides innatas, así como con la participación en la vía IL-23/STAT3 donde polimorfismos asociados a los genes tanto del IL23R o STAT3 podrían ser un indicativo de susceptibilidad a la enfermedad (74).

Algunas de las manifestaciones en este tipo de patología son el denso infiltrado de macrófagos, como lo expuso Braun et al en 1995,así como la presencia de mRNA del TNF-α a nivel de las articulaciones sacroilíacas (26). Un papel clave de la citocina TNF ha sido mostrado a través de la eficacia de los bloqueadores biológicos.

En contraste, existe evidencia de un papel protagónico para TNF-α en algunos modelos que proponen asociaciones entre todo el grupo de EAS y enfermedad inflamatoria intestinal, donde pacientes pueden desarrollar lesiones intestinales similares a la enfermedad de Crohn, así como la expresión de TNF-α a nivel intestinal (75).

1.4.6 Polimorfismo -308 del TNF-α en EAS

Hasta el momento se ha inferido en el rol de ciertos factores genéticos en la patogénesis de las EAS, aunque solo del 20 al 50% de la población de pacientes con EA podría explicar la susceptibilidad genética basados en la presencia del HLA-B27. Por tal razón, algunos investigadores han planteado otros factores que podrían estar vinculados a susceptibilidad a la enfermedad, siendo el TNF-α un blanco importante por ser una citocina inflamatoria y moduladora de la destrucción articular (76).

En el año 2006, Vargas et al. realizaron un estudio para evaluar los SNPs -308 y -208 en la región promotora del TNF-α en 229 pacientes mexicanos: 113 con EA, 92 con EASI, 24 con ARe y 169 controles sanos. El análisis demostró que la frecuencia alélica T(2)A estaba aumentada en el grupo total de pacientes con EASI (p=0.05, pC=NS, OR =1.83); además, el alelo T(2)A (p=0.05, OR=2.4) y el genotipo T1T2(A/G) presentaron un valor (p= 0.05, pC= NS, OR =2.25) en el grupo de pacientes con EAS, por lo que fue planteado como un factor genético

asociado a susceptibilidad. Por otro lado, no hubo correlación significativa entre los genotipos y los datos clínicos; al mismo tiempo que la asociación fue independiente de la susceptibilidad conferida por el alelo HLA-B27 en este grupo de pacientes (77).

Posteriormente en Colombia, Romero et al. evaluaron la correlación existente entre la presencia del polimorfismo -308 del TNF-α con: niveles séricos de la proteína, la expresión del HLA-B27, edad, inicio de los síntomas, subtipos de EAS y la actividad de la enfermedad respecto a controles sanos. Los resultados de las comparaciones del genotipo -308A del TNF-α entre controles sanos y pacientes con EAS arrojó un (p=0.004), pacientes con EASI (p=0.040), pacientes con ARe (p=0.001), los cuales fueron estadísticamente significativos. Por otro lado, la comparación entre los alelos para las EAS obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (p=0.007), entre los pacientes con EAS y controles. En resumen, los resultados obtenidos evidencian que la frecuencia del genotipo -308A del TNF-α entre pacientes con EAS y controles sanos fue diferente en la población colombiana en estudio, y no hubo correlación significativa con los índices clínicos de actividad y función, TNF-α a nivel sérico y el HLA-B27. Sin embargo, la presencia del alelo -308A del TNF-α en pacientes con EAS sugiere que este SNP no ejerce un efecto protector para las EAS (78).

En el 2013 Ji et al., evaluó la posible asociación entre la EA y algunos SNPs (-238, -308,-850, -857, -863 locus, and TNF-β +252) en la región promotora del gen TNF-α y sus haplotipos asociados, para lo cual uso el método de PCR-RFLP en pacientes con EA progresiva, EA estable y controles. Como resultado, concluyen que los SNPs -857 y -850 aumentan la susceptibilidad a EA, aunque no reflejen el estado activo de la enfermedad. Mientras que el SNP -308 puede ser un indicativo débil del estado activo de la enfermedad (79).

Estudios reportan el posible vínculo entre ciertos SNPs del TNF-α como factor predictor en cuanto a la respuesta al tratamiento con ciertos fármacos biológicos. Para ilustrar este

planteamiento, Tong et al. efectuaron un metaanálisis utilizando como referencia a los SNPs -308 A/G y -857 C/T, a través de seis estudios con pacientes que cursaban con EAS y EII, cuyos resultados proponen que tanto los pacientes portadores del alelo común G y C, respectivamente, como del genotipo G/G para el -308(OR: 2.31; 95% CI: 1.36–3.91; p = 0.002) y el genotipo C/C para el -857 (OR: 3.66; 95% CI: 1.35–9.92; p = 0.01) tenían mejor respuesta a la terapia biológica. Para tal efecto consideraron los siguientes criterios de respuesta: (Espondilitis Anquilosante: BASDAI); (Enfermedad de Crohn: CDAI); (Psoriasis: PASI)(80).

Otro hallazgo importante fue hecho por Murdaca et al. (2014), quienes evaluaron la asociación de ciertos SNPs (-238, -308, y +489) a nivel del gen del TNF-α en relación con la susceptibilidad y respuesta a inhibidores del TNF-α (Adalimumab, Etanercept e Infliximab) en 57 pacientes caucásicos con Artritis Psoriásica y 155 controles sanos. Sin embargo, no encontraron diferencias para los alelos -238 y -308, pero sí para el alelo +489 *(p*= 0.0136*)*conrespecto al tratamiento con Etanercept en el grupo de pacientes con PsA (4).

En adición a estos planteamientos, es interesante para nosotros poder vincular la inmunogenicidad a la pérdida de efectividad de la terapia biológica para estos pacientes y la presencia del SNP -308 del TNF-α, sin regirnos únicamente por asociaciones entre el SNP -308 del TNF-α y los índices que definen la actividad de la enfermedad, es decir escalas visuales análogas.

1.4.7 Inmunogenicidad en EAS

Hasta la fecha, muchos individuos -por distintas razones- han sido tratados con anticuerpos monoclonales de forma terapéutica. El grupo de Bacquet-Deschryver et al., ha inferido respecto al impacto que puede tener el uso de tres fármacos Anti-TNF-α (Infliximab, Etanercept y Adalimumab) en 156 pacientes con AR y 95 con EAS (58 con EA y 37 con APs) a través de un estudio retrospectivo durante dos años en el cual se consideraron aspectos clínicos y

biológicos como: anticuerpos antinucleares (ANAS), anticuerpos anti doble cadena (dsDNA), factor reumatoide (FR) y anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado (Anti-CCP)(81).

Los títulos de ANAS y de Anti-dsDNA incrementaron significativamente ($p < 0.001$), aun así fue menor en aquellos pacientes que recibieron Infliximab comparado con Etanercept en ambas enfermedades reumáticas, y que Adalimumab en los pacientes con AR. En síntesis, plantearon que las respuestas terapéuticas eran independientes de los títulos de ANA y anti-dsDNA para ambas patologías y que destacaba la disminución de los títulos del FR pero no de los niveles de anticuerpos Anti-CCP con respecto al tratamiento biológico que recibieron(81).

En contraste, en el año 2009 Vries et al., evaluaron la respuesta clínica de pacientes que cursaban con EA y que estaban en tratamiento con Etanercept en comparación con los niveles séricos del medicamento y la presencia de ADAs. La población fue de 53 pacientes, quienes recibieron 25 mg. según consideraciones del grupo ASAS para Etarnercept, dos veces por semana. El resultado obtenido fue la ausencia de ADAs, además los niveles séricos de la medicina no se vieron alterados entre los pacientes respondedores y no respondedores. Los niveles de Etanercept se midieron a través de una nueva técnica de ELISA, basados en el principio de que el medicamento es capturado de acuerdo a su habilidad para unirse al TNF-α, la sensibilidad de detección fue de 1 ng/ml. Como resultado, el 76% de los pacientes con EA fueron clasificados como respondedores al Etanercept después de tres meses de tratamiento. En contra parte no hubo correlación entre la concentración del medicamento, la formación de ADAs y la respuesta clínica. También cabe destacar estudios anteriores hechos por estos investigadores con Infliximab y Adalimumab, donde sí observaron una correlación entre la disminución de la respuesta al tratamiento, así como la aparición de ADAs, lo cual hace pensar a los autores que el Etanercept podría ser menos inmunogénico (82).

Por otra parte, un estudio basado en investigar la relevancia clínica de ADAs contra Infliximab en 94 pacientes con EAS que habían sido sometidos al tratamiento por un periodo prolongado (desde el año 1999 al año 2010), demuestra una pobre respuesta clínica y la aparición de reacciones a la infusión (83).

En el año 2013, Placencia et al. realizaron un estudio en el que plantean si la respuesta a un segundo fármaco biológico anti-TNF-α se relaciona con el previo desarrollo de ADAs al tratamiento de inicio; por lo cual evaluaron a 42 pacientes que habían fallado al tratamiento a través del índice ASDAS (en inglés, *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*), encontrando que la presencia de ADAs predice una mejor respuesta clínica a un segundo fármaco biológico(84).

Por otro lado, Garcés et al. proponen a través de un metaanálisis cómo la inmunogenicidad a ciertos biológicos es el mecanismo detrás del fracaso al tratamiento, pero también consideran que este efecto puede ser atenuado mediante el uso de tratamiento concomitante (85).

1.5 Artritis Reumatoide

1.5.1 Definición

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter progresivo que produce dolor, rigidez, tumefacción de las articulaciones y además con el tiempo puede llegar a generar deformaciones importantes produciendo distintos grados de discapacidad y limitación en la calidad de vida (86).

1.5.2 Diagnóstico de la AR

Cada enfermedad puede caracterizarse por síntomas específicos. En el caso de la AR, el ACR (en inglés, *American College of Rheumatology*) estableció criterios de clasificación en

1987, gracias a los cuales se considera AR probable cuando están presentes 4 o más criterios, de los siete expuestos a continuación (87).

1	Rigidez Matutina	Rigidez matutina articular que dura al menos 1 hora.
2	Artritis de tres o más grupos de articulaciones	Al menos tres grupos de articulaciones deben estar inflamadas simultáneamente. Algunos grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.
3	Artritis de articulaciones de las manos.	Al menos una articulación de las manos debe estar inflamada.
4	Artritis Simétrica	Afectación simultanea del mismo grupo articular.
5	Nódulos Reumáticos	Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, superficiales de extensión o en zonas yuxta-articulares.
6	Factor Reumatoide en suero	Presencia de valores elevados
7	Alteraciones Radiológicas	Debe existir erosión u osteoporosis yuxtarticular clara y definida en articulaciones afectadas.

Tabla 5. Criterio diagnóstico de AR.

Adicionalmente, se consideran los criterios de clasificación del ACR/EULAR 2010 para la clasificación de la AR. Un paciente será clasificado con AR si la suma total es igual o superior a 6 (88).

Afectación articular	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
>10 articulaciones pequeñas afectadas	5
Serología	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3VN)	2
FR y/o ACPA positivos alto (>3VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR levadas	1
Duración	
<6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: Factor Reumatoide; PCR: Proteína C Reactiva: VN: Valor normal, VSG: Velocidad de sedimentación globular.

Tabla 6. Conjunto de variables y puntuación para el cómputo global.

1.5.3 Etiología de la AR

Se plantea el mecanismo inmunológico como el más relevante para proponer la etiología de esta enfermedad, estableciéndose como un proceso fisiopatológico en el cual el organismo responde a un daño inflamatorio producido en el propio tejido en el que participan mediadores celulares y humorales. El tipo de inflamación que caracteriza a esta entidad es de tipo crónico, lo cual genera extravasación y migración de monocitos y linfocitos. En consecuencia, se produce vasodilatación, permeabilidad vascular y adhesión de leucocitos debido a la participación de sustancias solubles proinflamatorias (89).

Algunos mediadores pro inflamatorios involucrados son: IL-1, IL-6, IL-12, IFN-γ y TNF-α. El TNF-α es uno de los más importantes ya que su acción central es la activación de macrófagos, PMN, linfocitos T y también es capaz de producir otros mediadores solubles (PGs, LTs, PAF, Bradicinas, etc.). A medida que se ha ido conociendo la fisiopatología y los mecanismos inflamatorios que rigen el daño articular en este tipo de enfermedad, también se han involucrado algunos genes que explicarían la predisposición genética en relación a la cronicidad de la enfermedad, tal como el gen *tnf-α*; aunque se ha descrito que los linfocitos TCD4+ antigénicamente activados podrían ser mediadores centrales de la inflamación y daño articular, ya que secretan IFN-γ e IL-17, estimulando así la secreción por parte de los macrófagos de IL-1, IL-6 y TNF-α. Dicho de otro modo, la sobreexpresión de TNF-α e IL-1 son vitales tanto en el proceso inflamatorio como en el daño articular (7).

En el año 1991, Keffer et al. reportaron un modelo genético predictivo de artritis en ratones transgénicos que sobre expresaban el TNF-α tipo salvaje y el TNF-α humano (hTNF-α), con el propósito de evaluar los efectos de la producción normal y anormal de esta citocina in vivo. Los resultados indicaron que modificaciones en la región 3' del hTNF-α resultó en la aparición de poliartritis inflamatoria crónica, pero que pudo ser prevenida mediante la

administración de anticuerpos monoclonales contra hTNF-α, por lo que estos hallazgos evidencian la importancia del TNF-α en la patogénesis de la artritis (90).

1.5.4 Factores genéticos relacionados a la AR

La región del antígeno leucocitario humano (HLA) en el genoma es el más heterogéneo y muchas enfermedades son conocidas por estar asociadas con esta región. Desde la década de 1980 se ha explicado la fuerte asociación del alelo HLA-DR con la AR, donde los alelos que codifican cinco aminoácidos en la posición 70-74 de la cadena de HLA-DRβ1, conocido (en inglés, *Shared Epitope* SE) o epítopo compartido estarían sobre expresados en pacientes con AR (91). Aunque estas hipótesis no son definitivas, constituyen datos importantes que apoyan la susceptibilidad genética en la AR.

Así pues en genética se han realizado estudios de asociación del genoma completo GWAS (en inglés, *Genome Wide Association Study*), el cual permite realizar análisis de variación genética a lo largo del genoma humano con el propósito de identificar asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido y ciertas enfermedades como es el caso específico de la AR. De allí que estudios en cohortes a gran escala hayan permitido la evaluación simultánea de miles de genes con respecto a la susceptibilidad a ciertas enfermedades, determinar el fenotipo de la enfermedad e incluso la respuesta a la terapia (92). En consecuencia, los alelos asociados con la susceptibilidad a la AR según el estudio GWAS se muestran a continuación:

Gen Candidato	Locus	SNP	OR
PTPN22	1	Rs2476601	1.23-1.75
PADI4	1	Rs 2240340a	1.4
STAT4 T/C	2	Rs1188934	1.22 (0.98-1.53)
FCGR2A	1	Rs12746613	1.1
CTLA4	2	Rs3087243	0.75-1.136
CCL21	9	Rs2812378	1.1
TRAF1	9	Rs3761847	1.1 (0.97-1.32)
IRF5	7	Rs10488631	1.16 (0.72-1.87)
CCR6	6	Rs3093023	0.79 (0.64-0.98)
CD40	20	Rs4810485	0.91-1.02
IL2RA	10	Rs2104286	0.92

Tabla 7. Los alelos más relevantes asociados a la susceptibilidad de la AR, según estudios de asociación GWAS**.**

1.5.5 Epidemiología de la AR

Estudios a nivel mundial de incidencia y prevalencia han reportado en las últimas décadas variaciones considerables sobre todo en el norte de Europa y América donde se estima una prevalencia del 0.5% al 1%, y una incidencia media anual de 0.02-0.05%. Aunque la AR afecta principalmente a las mujeres en una proporción de 3 a 1 con relación a los hombres y su prevalencia en la población latinoamericana es cercana al 0.5%, está enfermedad aumenta con la edad y la diferencia entre géneros disminuye en el grupo de edad avanzada. Comúnmente la AR inicia durante la cuarta y quinta década de la vida, por lo tanto el pico de incidencia ocurre entre los 35 y 50 años de edad (93, 94).

Paralelamente, la AR produce un aumento en la mortalidad y la supervivencia en estos pacientes disminuye de 3 a 10 años; además es una patología multifactorial por lo que se hace necesario establecer las diversas interacciones que influyen en su incidencia y expresión. Dentro de ese marco, los principales factores de riesgo son: la susceptibilidad genética, el sexo, la edad, el tabaquismo, agentes infecciosos, hormonales, factores dietéticos, socioeconómicos y étnicos. Algunos autores exponen que la AR y la EA son patologías complejas en las que muchas veces la herencia no está sujeta exclusivamente a leyes mendelianas, ya que son enfermedades

poligénicas, por lo que la complejidad en este tipo de enfermedades puede extenderse a factores no genéticos en los que se incluyen eventos evolutivos e históricos que catalogan a las enfermedades autoinmunes como un fenómeno poblacional y no individual (95).

Por todo lo anterior, la epidemiología genética ha hecho esfuerzos por estudiar la interacción entre los factores genéticos y ambientales que dan origen a las enfermedades del ser humano, a veces llamados "estudios de asociación". El TDT (en inglés, *Transmission Disequilibrium Testing*) es un método que ha sido utilizado para examinar genes candidatos que tienen marcadores altamente polimórficos, ya sean dentro del gen o dentro de una distancia pequeña a la secuencia de codificación. Sobre el asunto se han publicado análisis relacionados con el CMH y su asociación con la AR, así como la participación del gen *tnf*. Mediante este método se ha demostrado que el TNF está asociado al haplotipo A1, B8 y DR3, vinculándolo con la AR (96).

1.5.6 Citocinas involucradas en el proceso inflamatorio de la AR

A finales de 1980, nuevas técnicas moleculares estaban disponibles para medir citocinas en el sinovial, lo cual ofreció la oportunidad de estudiar el rol de las células T como una de las causas inductora en la AR. Sin embargo, una de las observaciones más representativas fue la baja concentración de IL-2 e INF-γ por parte de las células T; así como la aparición de macrófagos, fibroblastos y niveles elevados de IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF-α, GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos) y varias quimiocinas, producidos por la membrana sinovial reumatoide. Además, la aparición de citocinas supresoras como el TGF-β y IL-1R y como resultado la presencia de mecanismos de señalización anti-inflamatorios; como es el caso del supresor SOCS3 (en inglés, *Suppressor of Cytokine Signaling-3*)el cual se expresa en la AR, aunque los niveles son bajos como para bloquear la sinovitis.

Al mismo tiempo, los macrófagos y fibroblastos se encuentran adyacentes en la íntima del revestimiento sinovial e incluso producen citocinas con actividad autocrina y paracrina. Entre las citocinas pro inflamatorias que ejercen función autocrina al macrófago se encuentran: IL-15, GM-CSF, M-CSF, TNF-α, mientras que en los fibroblastos intervienen: TGF-β y FGF (en inglés,*Fibro Blast Growth Factors*). Entre las citocinas que ejercen función paracrina y pro inflamatorias, se encuentran: IL-1, IL-18, TNF-α, IL-8, IL-6, GM-CSF, IL-17 e INF-γ; y con respecto a aquellas que ejercen función anti-inflamatoria, tenemos: IL-10, IL-1Ra, sTNF-R, IL-4 (97).

Posteriormente en el año 2007, McInnes et al, enuncian en un estudio gran parte de las citocinas que están involucradas en la patogénesis de la AR como: IL-1α, IL-1β, IL-18, TNF-α, LT-α, LTβ, RANKL (en inglés, *Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand*), BAFF (en inglés, *B-Cell activating Factor*); APRIL (en inglés, *a Proliferation-Inducing Ligand*), IL-17A, IL-12, IL-23, IL-7, IL-15, IL-10, IL-6, Oncostatina M, TGF-β, familia BMP (en inglés, *Bone Morphogenetic Protein)*;PDGF (en inglés, *Platelet-Derived Growth Factor*); familia FGF, VEGF (en inglés, *Vascular Endotelial Growth Factor*), IL-32, MIF (en inglés, *Macrophage migration-Inhibitory Factor*), Interferón Tipo I (98). A pesar de que algunas citocinas son parte de blanco terapéutico actual, sigue siendo un desafío el tratamiento de la AR debido a la respuesta parcial o ausente de algunos pacientes.

Citocina	Expresión a nivel de células articulares	Función Potencial en la patogénesis de la AR
IL-1α y/o IL-1β	Monocito, células B, Fibroblastos sinoviales, condorcitos.	↑liberación de citocinas en fibroblastos sinoviales, MMP, iNOS y PG; ↑Citocinas en monocitos, liberación de ROI y PG, ↓en la síntesis de GAG, expresión de moléculas de adhesión.
IL-18	Monocitos, PMNs, DCs, plaquetas, células endoteliales.	Diferenciación de células T(Células Th1 con IL-12; células Th2 con IL-4); Activación de células NK, ↓condrocitos y síntesis de GAG, expresión de iNOS, activación de PMN.
TNF	Monocitos, células T, células B, células NK, PMNs, fibroblastos sinoviales, osteoblastos.	↑ Activación de monocitos, liberación de citocinas y PG, PMN, apoptosis,↑ aumento en la expresión de células de adhesión,síntesis de colágeno y proliferación de fibroblastos sinoviales, efecto endocrino,
LTα y/o LTβ	Células T, monocitos, fibroblastos sinoviales	Desarrollo de órgano linfoide periférico, bioactividad similar a TNF-α.
RANKL	Células Estromales, osteoblastos, células T	Estimula la vía de reabsorción ósea y de maduración de osteoclastos, modula la interacción entre células T-CDs.
BAFF	Monocitos, células T, DCs.	Proliferación de células B, secreción de anticuerpos, cambio de isotipo, co estimulación de células T.
ABRIL	Monocitos y células T	Proliferación de células B.
IL-17A	Células Th17, Fibroblastos sinoviales	↑ Citocinas por fibroblastos sinoviales, liberación de MMP, osteoclastogénesis,↓síntesis de GAG por parte de los condrocitos↑ producción de citocinas por parte de los leucocitos.
IL-12	Macrófagos, células dendríticas.	Maduración y proliferación de células Th1, Activación de células B, citotoxicidad por parte de las células NK y células T.
IL-23	Macrófagos, células dendríticas.	Proliferación de células Th17.
IL-7	Fibroblastos sinoviales, monocitos?	Expresión de células T, activación de macrófagos, maduración de células NK.
IL-15	Monocitos, fibroblastos sinoviales, células B, PMNs, Células dendríticas.	Diferenciación de las células B y cambio de isotipo, citotoxicidad y activación de células NK, activación de fibroblastos sinoviales, activación de macrófagos.
IL-10	Monocitos, células T y B, Células dendríticas, células epiteliales.	↑Liberación de citocinas por parte de los macrófagos, expresión de receptores solubles iNOS, ROI, inducción de anergia, ↓expresión MHC, maduración de células T reguladoras, liberación de colágeno,↑cambio de isotipo por parte de las células B.
IL-6	Monocitos, fibroblastos sinoviales, Células B y células T.	Proliferación de células B y producción de anticuerpos, trombopoyesis y hematopoyesis,↑ proliferación de células T,↑aumento hepático de proteínas de fase aguda.

Abreviaturas: (en inglés: APRIL, proliferation-inducing ligand; BAFF, B-cell activating factor; BMP, bone morphogenetic protein; DC, dendritic cell; GAG, glycosaminoglycans; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; MMP, matrix metalloproteinase; NK, natural killer; PG, prostaglandin;

PMN, polymorphonuclear leukocyte; ROI, reactive oxygen intermediate; TGFβ, transforming growth factor-β; TH, T helper; TNF, tumour-necrosis factor; TReg, regulatory T).
Tabla 8. Actividad de ciertas citocinas implicadas en la patogénesis de la AR, tomado de (98).

1.5.7 Polimorfismo -308 del TNF-α en AR

De todos los SNPs que afectan la región promotora del gen *tnf-α*, el que se encuentra en la posición -308 parece ser el más asociado con respecto a la susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes y consiste en la sustitución de una guanina (G) por una adenina (A), generándose los alelos TNF1 y TNF2 genotipos G/A o A/A, respectivamente. Estos hallazgos quedaron de manifiesto en 1997 cuando Wilson et al. demostraron el efecto de un polimorfismo en la región promotora del gen *tnf-α* con respecto a la activación transcripcional, en lo que ellos denominaron alelo TNF2 con respecto al alelo TNF1 (99).

La evolución histórica de las enfermedades autoinmunes y las hipótesis sobre la participación de los SNP's ubicados en el gen promotor del TNF-α, sigue siendo un área de amplio estudio. En el año 2003 Cuenca et al, evaluaron la asociación del SNP -308 del TNF-α y la susceptibilidad a desarrollar AR en pacientes chilenos, a través de la sobreexpresión de TNF inducido por LPS utilizando el sistema WBCS (en inglés,*Whole blood culture system*) ex vivo. Paralelamente los investigadores evaluaron citotoxicidad en fibroblastos murinos de la línea celular L929 para avaluar la actividad biológica del TNF-α. En resumen, los resultados demostraron que el alelo TNF2 se encontró en el 23% de los pacientes con AR y el 10% de los controles, donde ambos grupos presentaron una alta variabilidad en cuanto a la concentración sérica de TNF-α, niveles de TNF-α inducido por LPS y en la citotoxicidad de la citocina en la línea celular L929. Sin embargo, los autores concluyen que estas diferencias no estaban asociadas al SNP -308 del TNF-α (100).

Posteriormente en el año 2005 en México se determinó la frecuencia del polimorfismo -308 del TNF-α correlacionado con la severidad en AR, donde se demostró una frecuencia

incrementada para el alelo (A)-308T2 en AR severa comparado con enfermedad no severa y controles sanos; la clasificación de los sujetos se hizo de acuerdo a los criterios de ACR y las siguientes variables: HAQ-DI, erosiones, factor reumatoide, manifestaciones extra articulares, entre otras. En síntesis, los datos exponen que el alelo (A)-308T2 estaba asociado con susceptibilidad al desarrollo de AR severa en mexicanos (101).

Análogamente en el 2007, el grupo de Lee et al, a través de un metaanálisis reunieron 14 estudios (10 europeos, 3 latinoamericanos y uno asiático), en los que se asoció la presencia del alelo A -308 del TNF-α y la AR; pero al comparar la población general no se encontró asociación entre el alelo A -308 del TNF-α (OR 1.005; IC 95% 0.715-1.412, p = 0.976). Sin embargo, la estratificación por grupo étnico indicó que este alelo para TNF-α tenía asociación significativa con la AR en la población latinoamericana de: Brasil, México, Colombia y Chile, (OR 2.004, IC 95% 1.158-3.467, p = 0.013). En contraste, no hubo asociación detectada para el alelo A del TNF-α en los pacientes con AR de las muestras europeas (OR 0.911, IC 95% 0.684 -1.212, p = 0.520); y por último, proponen que el genotipo A/G para el SNP-308 del TNF-α podría representar un factor de riesgo significativo para los pacientes latinoamericanos con AR, pero no para los europeos (102).

En contra parte, Oregón et al, evaluaron el SNP -308 y -238 del TNF-α en 50 pacientes con AR y 100 controles sanos, por medio de: PCR-RFLP para la identificación de los SNPs, qPCR (en inglés, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) para evaluar la expresión de mRNA y los niveles de TNF-α por ensayo inmunoenzimático. La presencia del genotipo A/G fue mayor en los pacientes con AR que en los controles sanos y el genotipo G/G fue asociado con altos niveles de mRNA. En oposición, los investigadores no encontraron diferencias significativas para el SNP -208 y concluyeron que el SNP -308 podía ser considerado como un marcador de susceptibilidad en AR (103)

1.6 Inmunogenicidad en AR

La terapia biológica ha revolucionado el tratamiento de la AR; sin embargo, es importante considerar que algunos medicamentos presentan diferentes tasas de inmunogenicidad influenciado por la vía de administración, medicamentos concomitantes, dosis del fármaco, factores genéticos, edad y sexo, estatus nutricional e inmune, el tamaño y la estructura de la droga, el número de epítopes, la velocidad de depuración del complejo inmune y la solubilidad del fármaco. Paralelamente es necesario considerar que la detección de ADAs puede verse afectada por el tipo de ensayo de detección

Bender et al. (2006) realizaron un estudio para evaluar la formación de ADAs contra Adalimumab, eficacia y eventos adversos entre 15 pacientes con AR activa: 4 de ellos fueron tratados con Adalimumab como monoterapia y los 11 pacientes restantes con DMARDs concomitante. Así mismo, la actividad de la enfermedad fue medida por DAS28 y los ADAs fueron detectados por ELISA. Como resultado, la frecuencia en cuanto a la producción de anticuerpos anti-Adalimumab fue del 87% (13/15) detectados en niveles muy bajos y esta misma población abandonó la terapia dentro de las 45 semanas siguientes. Los resultados muestran que los cuatro pacientes tratados con Adalimumab y nueve que estaban recibiendo DMARDs como terapia concomitante presentaron ADAs; la densidad óptica (OD) de los niveles de HAHA fue dividida en tres grupos: pacientes con niveles bajos séricos ($0.02 \leq OD < 0.2$), nivel intermedio ($0.2 \leq OD < 1.0$) y nivel elevado de anticuerpos ($OD \geq 1$). Así, los autores concluyen que el Adalimumab a pesar de ser un fármaco humanizado puede inducir a la inmunogenicidad en un alto porcentaje de los pacientes que lo consumen (104).

Luego Van der Maas et al. (2012), a través de un estudio de cohorte longitudinal y observacional,evaluaron cambios a través del DAS28, niveles de Infliximab y ADAs en 147 pacientes con AR y con un índice DAS28 de 3.5 durante 18 meses; encontrando que el 27%

(95%CI: 20-42%) y el 44% (95%CI:36-52%) de los pacientes presentaron un DAS 28 por debajo de 2.6 o 3.2, respectivamente. Así mismo, niveles bajos de Infliximab prevalecieron en aquellos quienes tenían un DAS28>3.2 (48%, 95%CI: 37–59), pero este mismo comportamiento se observó en pacientes que presentaron baja actividad de la enfermedad (31%, 95%CI: 20–42). Por lo tanto plantean que tanto niveles séricos altos como bajos de Infliximabprevalecen en estos pacientes, e incluso en aquellos con baja actividad de la enfermedad (105).

Se ha demostrado que del 12% al 44% de los pacientes con AR, desarrollaron resistencia o reacciones adversas a los agentes anti-TNF-α, probablemente a causa de anticuerpos neutralizantes. El Infliximab y el Etanercept han sido utilizados durante un tiempo más prologando, por lo que su inmunogenicidad ha sido mejor caracterizada que lade los otros agentes. Además, la estructura quimérica, dosis, ruta de administración y frecuencia de administración de Infliximab aumentan su inmunogenicidad (106).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Principal

Establecer la presencia del polimorfismo -308 del TNF-α y su asociación con inmunogenicidad, niveles séricos de fármacos anti-TNF-α con la actividad clínica en pacientes con AR y EAS en el Hospital Militar Central.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia del SNP-308 en pacientes con AR, EAS y controles.
- Establecer la relación del SNP -308 con los niveles séricos de anticuerpos anti-fármaco anti-TNF-α.
- Evaluar la asociación entre la presencia del SNP -308, la inmunogenicidad, la actividad clínica de la enfermedad con anti-TNF-α en pacientes con AR y EAS.

3 Metodología

3.1 Generalidades del estudio

- **Tipo de estudio realizado**

Estudio observacional, analítico, de corte transversal.

- **Población blanco**

A todos los pacientes con diagnóstico de AR y EAS tratados con fármacos anti TNF-α en el servicio de Reumatología del Hospital Militar Central de Bogotá, se les informó la naturaleza y objeto de este estudio y con los aquellos que autorizaron su inclusión, se completó por escrito el correspondiente consentimiento informado, ver Anexo 2.

- **Población accesible**

Los 111 pacientes que se encuentren en tratamiento con fármacos biológicos anti TNF-α, con diagnóstico de AR y EAS en el Hospital Militar Central durante enero del 2013que asistieron a la aplicación del medicamento hasta mayo del 2014. Se realizó muestreo no probabilístico por conveniencia.

El grupo de pacientes analizados para el SNP -308 fue de 55 para EAS y 56 para AR.

El grupo de pacientes analizados para inmunogenicidad fue de 46 para EAS y 48 para AR.

- **Selección de la muestra**

Muestreo de corte transversal en el que se incluyeron los pacientes con diagnóstico de AR y EAS en tratamiento con Anti-TNF-α durante el 2013 en el Hospital Militar Central que asistieron a la .

Respecto a los controles se utilizó individuos sanos con un mínimo de tres generaciones en Colombia. Debido a que no se ha demostrado que el TNF-α y el alelo HLA-B27 estén influenciado por sexo y edad los controles no fueron pareados.

- **Criterios de inclusión**

  - Pacientes con diagnóstico de AR y EAS en tratamiento con anti-TNF-α en el Hospital Militar Central.

- Mayores de 18 años.
- Que estén de acuerdo con el estudio y firmen el consentimiento informado.

- **Criterios de exclusión**
  - Pacientes mujeres embarazadas.
  - Pacientes en quienes por razones diversas no se puedan completar los datos clínicos, de laboratorios.
  - Pacientes con diagnóstico y tratamiento en los últimos 5 años para enfermedades neoplásicas, excluyendo en piel cáncer basocelular.
  - Pacientes con dificultad de desplazamiento a la consulta.
  - Pacientes que rechacen participar en el estudio.

3.2 Extracción de ADN genómico

Con base en las muestras de sangre total obtenidas a partir depacientes con AR, EAS y controles sanos, se extrajo el ADN genómico– procedimiento que se realizó a partir de sangre anticoagulada con EDTA, usando el kit DNA 2000 (Corpogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante-. Se recolectaron 3 ml. de sangre venosa y luego de centrifugar, se tomó 350 µL de la capa de células blancas, se lavó 4 veces con 1 mL de solución de lavado para lisar los glóbulos rojos residuales y el botón celular final se homogenizó en 500 µL de buffer de lisis celular. Para desproteinizar esta solución, se adicionó 500 µL de solución salina, se centrifugó y 1 mL de sobrenadante fue transferido a otro tubo para precipitar el DNA añadiendo 600 µL de isopropanol. El precipitado fue lavado con 250 µL de etanol al 70% y finalmente disuelto en 100 µL de solución de reconstitución y almacenado a -20ºC hasta su uso.

3.3 PCR-RFLP

La identificación del SNP -308 del TNF-α, se realizó de acuerdo con lo planteado por Wilson et al (99), usando los siguientes iniciadores: sentido 5´-

AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3´, el cual posee una modificación que incorpora un sitio de restricción para la enzima NcoI (nucleótido subrayado) y antisentido 5´-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3´. Adicionalmente en la reacción de PCR se incluyó buffer de reacción 1X, MgCl2 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.25 µM de cada primer, 1.25 U de Taq polimerasa y 100 ng/µl de ADN obteniéndose un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo para denaturación a 94°C por 3 minutos, seguidamente 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. El producto amplificado de 107 pb fue usado en la técnica de RFLP, la cual se fundamenta en la detección de fragmentos de ADN de diferentes tamaños digerido con enzimas de restricción, en este caso se usó 2 U de la enzima NcoI (Promega) a 37°C por 4 horas. El producto final de la digestión enzimática se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 4% teñido con SYBR safe. La presencia de una sola banda de 107 pb será indicativo de una muestra de DNA homocigoto para el alelo TNF2 (-308A), la presencia de tres fragmentos de tamaños 107 pb, 87 pb y 20 pb será indicativo de una muestra de DNA heterocigoto para los alelos TNF1/TNF2 (-308G/-308A) y la presencia de dos fragmentos de tamaños 87 pb y 20 pb, será indicativo de una muestra de DNA homocigoto para el alelo TNF1 (-308G).

3.4 Detección de HLA-B27

Adicionalmente, mediante el Kit The Morgan™ HLA SSP B27 typing Taiwan, BioGene se hizo la determinación del alelo HLA B27. El protocolo establecía que las muestras de ADN de los pacientes con EAS debían ser ajustadas entre (10-40ng/µl) para luego realizar una reacción de PCR según las especificaciones del Kit, el cual incluía posteriormente una electroforesis en Gel de agarosa al 2%. La presencia de un fragmento de 140bp fue específico para HLA-B27, cabe

destacar la presencia de un control interno de 600bp para validar el resultado obtenido. Este ensayo también se llevo a cabo en los controles.

3.5 Determinación de la concentración de fármacos biológicos (anti-TNF-α) y anticuerpos anti- fármacos anti-TNF (ADAs) en suero

3.5.1 Adalimumab

Este análisis se realizó empleando la técnica de ELISA, para lo cual se usó el kit comercial PROMONITOR®-ADL (PROTEOMIKA) Bizkaia, España Ref. 5080230000. Para la determinación cuantitativa del Anti-TNF-α, esté kit emplea anticuerpos recombinantes dirigidos contra el fármaco biológico, los cuales están unidos a la superficie de cada pozo (en una placa de 96 pozos). Durante el ensayo se añadieron los calibradores prediluidos, controles (positivo: suero humano con anti-TNF-α y negativo: suero humano sin Anti-TNF-α) y las muestras de los pacientes diluidas (1:10 y 1:200) a pozos separados. Tras un tiempo de incubación, el fármaco biológico presente en la muestra se unió al anticuerpo recombinante preinmovilizado en la placa yel anti-TNF-α no unido se lavó. El fármaco biológico fue detectado mediante unión a un segundo anticuerpo acoplado a HRP, y seguidamente el revelado se realizó mediante la adición de un sustrato cromogénico. Por último, se midió la intensidad de color por medio de un espectrofotómetro a 450nm.

Niveles Adalimumab	Resultado	Interpretación
≤ 0.024 µg/mL	Negativo	Negativo
0.024 - 0.8 µg/mL	Positivo bajo	Niveles sub-terapéuticos
≥ 0.8 µg/mL	Positivo	Niveles terapéuticos

Tabla 9. Interpretación de la concentración de Adalimumab.

Por otro lado, en cuanto a la determinación cuantitativa de Anticuerpos Anti-fármaco (ADAs) se usó el kit PROMONITOR®-anti-ADL Ref. 5090230000 los pozos se encuentran pre tapizados con el fármaco biológico específico. Durante el ensayo, se añadieron los calibradores

pre diluidos, controles (positivo: suero humano con ADAs y negativo: suero humano sin ADAs) y las muestras de los pacientes (sin diluir y 1:10) a pozos separados. Consecutivamente tras una incubación, los ADAs presentes en la muestra se unieron al fármaco biológico previamente inmovilizado en la placa y la fracción de muestra no unida se lavó.

Posteriormente, los ADAs fueron detectados mediante la unión a un conjugado de Adalimumab acoplado a HRP. Seguidamente, se realizó un segundo paso de lavado en el que se retiró el exceso de conjugado, y la actividad de HRP en la placa se midió con la adición de un sustrato cromogénico, midiendo la intensidad de color por medio de un espectrofotómetro a 450 nm. La absorbancia medida fue proporcional a la cantidad de Anticuerpos Anti-fármaco presente en la muestra del paciente.

Anticuerpos Anti-Adalimumab	Resultado	Interpretación
>3.5 UA/mL	Positivo	Positivo a anticuerpos Anti-Adalimumab
≤3.5 UA/mL	Negativo	Negativo a anticuerpos Anti-Adalimumab

Tabla 10. Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-Adalimumab.

3.5.2 Infliximab

Para la medición de este medicamento se usó el Kit PROMONITOR®-IFX Ref. 5060130000, el cual es un ELISA de captura. Las tiras de ELISA estaban pretapizadas con un anticuerpo monoclonal humano anti-TNF-α unido a TNF-α humano recombinante. Este formato permitió que la estructura del TNF-α no se alterara y que el IFX reconociera el TNF-α. Durante el ensayo se añadieron los calibradores prediluidos, controles (positivo: suero humano con IFX y negativo: suero humano sin IFX) y las muestras diluidas de los pacientes (1:10 y 1:200) a pozos separados.

El IFX presente en las muestras se unió al TNF-α pre-inmovilizado en la placa. Tras un tiempo de incubación, la fracción de IFX no unida se lavó, y el fármaco se detectó mediante adición de un anticuerpo monoclonal anti-IFX acoplado a HRP. Una segunda incubación permitió que el conjugado se uniera al IFX. Tras un segundo paso de lavado, se retiró el exceso de conjugado y la actividad de HRP en la placa se midió mediante un sustrato cromogénico en un espectrofotómetro a 450nm. La absorbancia medida fue proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra del paciente.

Infliximab	**Resultado**	**Interpretación**
≤0.035 µg/mL	Negativo	Negativo a IFX
>0.035 µg/mL	Positivo	Positivo a IFX

Tabla 11. Interpretación de la concentración de Infliximab.

En contraste, la determinación de ADAs contra IFX se realizó mediante el kit PROMONITOR®-anti-IFX Ref. 5070130000, un ELISA puente. En este caso las tiras de ELISA se encontraban pretapizadas con IFX. El ensayo de tipo puente utilizó los dos brazos de las IgG de tipo 1, 2 y 3 para entrecruzar el IFX unido a la placa. Durante el ensayo se utilizaron los calibradores prediluidos, controles: (suero humano sin anticuerpos anti-IFX y suero humano con anticuerpos anti-IFX) y las muestras:(sin diluir y a una dilución de 1:10) de los pacientes a pozos separados. Tras una incubación, los anticuerpos anti-IFX presentes en la muestra se unieron al IFX previamente inmovilizado en la placa. La fracción de muestra no unida se lavó, y los anticuerpos anti-IFX se detectaron mediante unión a un conjugado de IFX acoplado a HRP. Una segunda incubación permitió que el IFX marcado se uniera a los anticuerpos anti-IFX inmovilizados en el pocillo. Tras un segundo paso de lavado se retiró el exceso de conjugado y la actividad de HRP en la placase midió mediante un sustrato cromogénico en un espectrofotómetro a 450nm. La señal obtenida fue proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

Anticuerpos Anti-Infliximab	Resultado	Interpretación
≤5 U/mL	Negativo	Negativo a Anticuerpos Anti-Infliximab
>5 U/mL	Positivo	Positivo a Anticuerpos Anti-Infliximab

Tabla 12. Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-IFX.

3.5.3 Etanercept

Para la medición de Etanercept se usó el kit PROMONITOR®-ETN Ref. 5110130000, el cual es un ELISA sándwich, en el que las tiras se encuentran pretapizadas con un anticuerpo monoclonal humano anti-ETN. Durante el ensayo, se añadieron los calibradores prediluidos, controles (suero humano sin ETN y suero humano con ETN) y las muestras diluidas (1:10 y 1:200) de los pacientes a pozos separados, permitiendo que el ETN presente en las muestras se uniera a los anticuerpos anti-ETN. La fracción de muestra no unida se lavó, y posteriormente se añadió un segundo anticuerpo monoclonal anti-ETN acoplado a HRP a cada pozo. Una segunda incubación permitió que este anticuerpo se uniera al fármaco ETN y tras lavar el exceso de anticuerpo anti-ETN conjugado a HRP, la actividad de la enzima se midió mediante un sustrato cromogénico en un espectrofotómetro a 450nm. La señal obtenida fue proporcional a la cantidad de fármaco presente en la muestra del paciente.

Etanercept	Resultado	Interpretación
≤0.035 μg/mL	Negativo	Negativo a ETN
>0.035 μg/mL	Positivo	Positivo a ETN

Tabla 13. Interpretación de la concentración de Etanercept.

Paralelamente se hizo la determinación de ADAs contra Etanercept mediante un ELISA puente, kit PROMONITOR®-anti-ETN Ref. 5120231000 en cuyo caso las tiras se encontraban pretapizadas con ETN. El ensayo de tipo puente utilizó los dos brazos de las IgG de tipo 1, 2 y 3 para entrecruzar el ETN unido a la placa. Durante el ensayo se utilizaron los calibradores prediluidos, controles: (suero humano sin anticuerpos anti-ETN y suero humano con anticuerpos

anti-ETN) y las muestras diluidas: (1:2 y 1:10) de los pacientes a pozos separados. Tras una incubación, los anticuerpos anti-ETN presentes en la muestra se unieron al ETN previamente inmovilizado en la placa. La fracción de muestra no unida se lavó, y los anticuerpos anti-ETN se detectaron mediante unión a un conjugado de ETN acoplado a HRP. Una segunda incubación permitió que el ETN marcado se uniera a los anticuerpos anti-ETN inmovilizados en el pozo. Tras un segundo paso de lavado, se retiró el exceso de conjugado y la actividad de HRP en la placa se midió mediante un sustrato cromogénico en un espectrofotómetro a 450nm. La señal obtenida fue proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra.

Anticuerpo Anti-Etanercept	**Resultado**	**Interpretación**
≤142UA/mL	Negativo	Negativo a anticuerpos anti-ETN
>142UA/mL	Positivo	Positivos a anticuerpos

Tabla 14 Interpretación de la concentración de Anticuerpos Anti-IFX.

3.6 Medición de PCR ultrasensible

Medición de PCR ultrasensible (Immulite 1000, Siemens®, Erlangen, Germany) REF. LKCRP1. Se realizó en suero por quimioluminiscencia definida como la emisión de luz asociada con la disipación de la energía con una sustancia electrónicamente excitada, tabla 15.

Negativo	≤3 mg/l.
Positivo	>3-9 mg/l.
Positivo Alto	≥ 9 mg/l.

Tabla 15.Interpretación de PCR Ultrasensible.

3.7 MEDICIONES DE VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN GLOBULAR

La determinación de la VSG se realizó por el método de Westergreen. Por medio de esta técnica se mide la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos en una hora, utilizando sangre anticoagulada que se introduce en una columna. La columna utilizada está graduada hasta $100mm^3$ con un diámetro de 1mm. El resultado al finalizar la hora cronometrada indicó cuantos

milímetros cúbicos se sedimentaron los glóbulos rojos durante ese periodo de tiempo. Valores de Referencia: <20mm/H Normal, ≥20mm/H aumentada.

3.8 Análisis estadístico

No se realizó estrategia de muestreo dado que el número de pacientes evaluados es igual a la población total que se encontraba en tratamiento con fármacos anti TNF-α en el servicio de reumatología e inmunología del Hospital Militar Central durante el tiempo de estudio.

El Software usado fue STATA 11.1 y en cuanto al análisis de los datos se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión para todas las variables clínicas y subgrupos, categorizados por severidad de la enfermedad, edad y sexo, según el diagnóstico. También se realizaron pruebas de asociación mediante Chi^2, U Mann -Whitney, Pearson entre las diferentes variables clínicas incluidos los índices de actividad de las patologías estudiadas para AR DAS 28 y para EAS BASDAI, la presencia del polimorfismo -308 del TNF-α, los títulos de anticuerpos contra fármacos anti-TNF-α y los niveles séricos del medicamento. Los valores de $p<0.05$ fueron considerados para establecer diferencias significativas.

El análisis descriptivo se hizo mediante el cálculo de frecuencias y porcentajes para variables cualitativas (enfermedad, subtipos de enfermedad, cambio de medicamento, sexo, pacientes en tratamientos con DMARDs, tipo de biológico anti-TNF-α actual, anti-TNF-α previos, evento adverso al biológico actual, tabaquismo); se calculó la media, desviación estándar, mediana, valor máximo y mínimo para variables cuantitativa (edad, tiempo con la enfermedad y en tratamiento con Anti-TNF-α, número de fármacos asociados distintos al grupo de los antireumáticos convencionales, enfermedades asociadas, DAS28-VSG, DAS28-PCR, HAQ, NAD, NAT, CDAI, BASFI, BASDAI, VSG y PCR). Se usó el test estadístico de UMann-Whitneypara establecer asociaciones estadísticas. Por otro lado, se realizó un análisis bivalente para comprobar las asociaciones entre las variables independientes y las dependientes. Si ambas

variables son de tipo numérico, el cálculo realizado fue el coeficiente de correlación de Pearson y regresión lineal. Si ambas variables son de tipo cualitativo el método estadístico fue el Test de Fisher.

4. Resultados

4.1 Población de pacientes con EAS

4.1.1 Características demográficas, índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes que cursan con EAS tratados con anti-TNF-α en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014).

La población de pacientes con EAS estuvo constituida por 55 individuos que tenían un promedio de edad cercano a los 40 años, con un tiempo de diagnóstico de 10 años; el promedio para el tiempo de tratamiento con terapia biológica osciló alrededor de 30 meses y los valores para los índices BASDAI y BASFI fue de 4.53±2.8 y 4.54±2.3, respectivamente, tabla 16.

n=55	Promedio	Mínimo	Máximo	DS
Edad (años)	45.18	24	79	14.37
Tiempo de Dx (años)	9.92	0	31	8.62
Tiempo de Terapia Biológica (meses)	30.31	2	159	36.39
BASFI	4.54	0	8.7	2.31
BASDAI	4.53	0	8.7	2.8

Abreviaturas: DS Desviación estándar; BASFI: *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*; BASDAI: *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*. Ver valores de Referencia Anexo 3.

Tabla 16. Características demográficas de los pacientes que cursan con EAS en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014).

También se observó que predominó el sexo masculino dentro del grupo de pacientes, con niveles de PCR y de VSG en rangos normales. Por último, la presencia del marcador genético HLA-B27 fue detectado en 22/55 individuos del total de pacientes con EAS, tabla 17.

Variable	Número (n)= 55	%
Sexo		
Hombre/Mujer	33/22	60/40
PCR		
>3mg/L	6/48	11/89
VSG		
>20 mm/H	14/37	27/73
HLA-B27		
Presente/Ausente	22/33	40/60

Abreviatura: PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; HLA- B27: Antígeno Leucocitario B27.Datos representados en valores de %. Valores de referencia de PCR y VSG. Ver valores de referencia Anexo 3.

Tabla 17. Distribución de frecuencias respecto a sexo, proteína C reactiva, VSG y presencia del alelo HLA-B27 en pacientes con EAS**.**

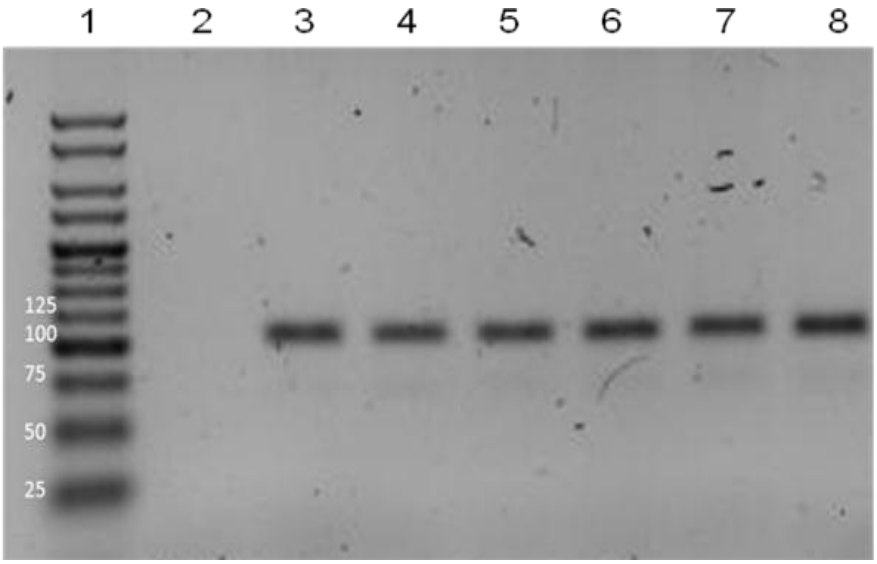
De los 55 pacientes con EAS, 19 estaban recibiendo Adalimumab,19 Infliximab, y solo 8 estaban bajo tratamiento con Etanercept. De esta población, el 45.45% (n=25/55) había recibido un biológico previo y el 10.90% (n=6/55) había recibido dos biológicos previos al tratamiento actual. El cambio en la mayor parte de los casos fue indicado por falla terapéutica.

Dentro de los antecedentes clínicos evaluados en los pacientes con EAS y la distribución de comorbilidades, se halló: Hipotiroidismo en un 10.90%, Hipertensión en un 18.18%, Diabetes en un 3.63%, Enfermedad Pulmonar en un 3.63%, Dislipidemia en un 12.72%, Cardiopatía en un 1.81%. En el momento del estudio, solo 7eran fumadores activos 12.72% y un 47.27% refirió historia de tabaquismo.

4.1.2 Determinación del SNP -308 del TNF-α.

En la población de pacientes con EAS los genotipos encontrados fueron: (G/G=48 y A/G=7) y de acuerdo con los sub-tipos de EAS: EA (G/G=22 y A/G=2); EASI (G/G=14 y A/G=4) y otras EAS (G/G=12 y A/G=1). Con respecto a la frecuencia alélica de la población general los resultados fueron: G=103 y A=7; y por subtipos: EA: (G=46 y A=2); EASI: (G=32 y A=4) y otras EAS (G=25 y A=1).

A continuación, los resultados obtenidos a partir de la PCR-RFLP del ADN genómico de las muestras de sangre periférica de los pacientes con EAS, figuras 3 y 4.



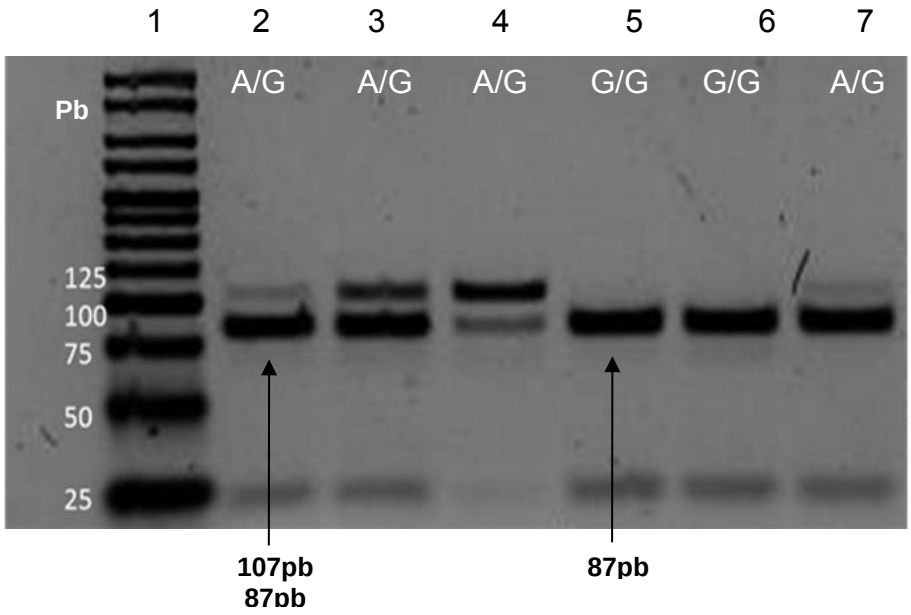
Gel de agarosa al 4% teñido con SYBR safe. En la línea 1 se observa el patrón de peso molecular, en la línea 2 el blanco de la reacción (control negativo), y por último de la línea 3 a la línea 8 el resultado de la PCR de diferentes pacientes, fragmento de 107pb.

Figura 3. Producto de PCR antes de digestión con la enzima NcoI.

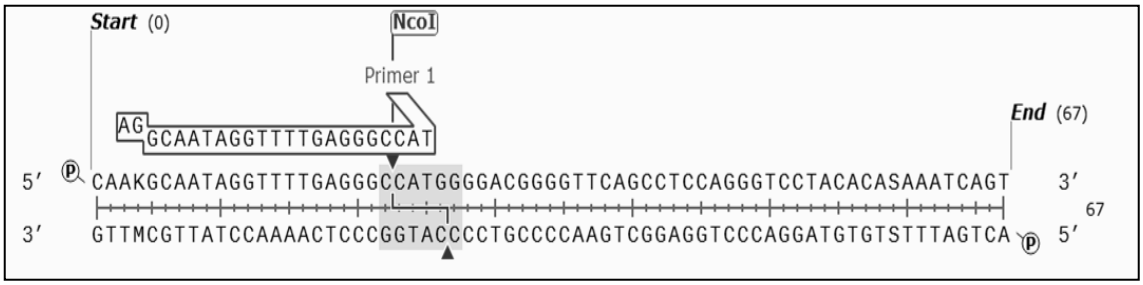
Posteriormente el amplificado fue digerido con la enzima NcoI, de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos, para un homocigoto normal G/G. Se observó una banda de 87 pb y para el heterocigoto A/G se observaron tres bandas de107, 87pb y 20 pb, respectivamente.

Para precisar los hallazgos obtenidos, se realizó un análisis de secuenciación de una muestra tanto para el genotipo TNF1/TNF1 como para el genotipo TNF2/TNF1; los resultados demostraron la correcta presencia de los fragmentos específicos para cada uno de los genotipos, así como el sitio de corte para la Enzima NcoI cuando correspondió, figura 5.

En resumen, se observó la presencia del genotipo silvestre G/G en el 87.2% de los pacientes, el genotipo mutante A/G en el 12.7% y no se identificaron sujetos homocigotos A/A en la población con EAS. Adicionalmente, no hubo diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba estadística Chi^2 entre controles sanos y subtipos de EAS.



Gel de agarosa al 4%, teñido con SYBR safe. La línea 1 muestra el marcador de peso molecular; las líneas 2-4,7 aquellos pacientes portadores del genotipo TNF2/TNF1 para el SNP -308 del TNF-α, mientras que las líneas 5 y 6 representó a los pacientes con el genotipo TNF1/TNF1. Marcado de peso molecular de 25pb, pb: pares de bases.
Figura 4. Producto de PCR después de digestión con la enzima NcoI.



Se observa el primer A1 sentido 5´- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3´, el cual posee una modificación que incorpora un sitio de restricción para la enzima NcoI, generando dos fragmentos 20pb y 87 pb, dicho análisis se llevó a cabo a través del programa Snapgene.
Figura 5. Secuencia para el genotipo TNF1/TNF1.

Al realizar el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg para conocer si el SNP -308 del TNF-α se regía por las leyes de la genética de poblaciones en controles y pacientes, se encontró que la población era homogénea debido a que el valor de *p* no fue significativo.

Sujetos	Genotipo				Alelo		
	G/G n (%)	A/G n(%)	A/A n(%)	*p*	G n (%)	A n (%)	*p*
EAS(55)	48(87.2)	7(12.7)	0(0)	*0.787*	103(93.6)	7(6.3)	*0.794*
EA(24)	22(91.6)	2(8.3)	0(0)	*0.747*	46(95.8)	2(4.16)	*0.755*
EASI(18)	14(77.7)	4(22.2)	0(0)	*0.482*	32(88.8)	4(11.1)	*0.331*
Otros(13)	12(92.3)	1(7.6)	0(0)	*1.000*	25(96.1)	1(3.8)	*1.000*
Controles(155)	133(85.8)	22(14.1)	0(0)				

EAS: Espondiloartritis, EA: Espondilitis Anquilosante, EASI: Espondiloartritis Indiferenciada.
Medidas de asociación mediante la prueba de Fisher.

Tabla 18. Frecuencia entre genotipo/alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con EAS y controles sanos.

Adicionalmente se hizo un análisis entre la presencia del genotipo (G/G y A/G), alelos (A y G), algunas variables de estudio, sin encontrar ningún tipo de asociación.

Variable	G/G n	A/G n	*p*
BASDAI			
Inactivo	17	2	0.52
Activo	30	5	
BASFI			
Funcional	20	2	0.37
Disfuncional	26	5	
VSG			
Normal	31	6	0.37
Aumentada	13	1	
PCR			
Normal	40	7	0.40
Aumentada	6	0	
Anti TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)			
Sub- terapéutico	7	2	0.41
Terapéutico	32	5	
ADAs			
Negativos	30	6	0.52
Positivos	9	1	

Tabla 19. Asociación entre genotipos, variables clínicas, Anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) y ADAs en pacientes con EAS.

Abreviaturas: P: valor p; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva; ADAs: Antibody Anti-Drugs.*

* Diferencias calculadas mediante prueba de Test de Fisher

Variable	G n	A n	*p*
BASDAI			
Inactivo	34	4	0.40
Activo	60	10	
BASFI			
Funcional	40	4	0.22
Disfuncional	52	10	
VSG			
Normal	62	12	0.19
Aumentada	26	2	
PCR			
Normal	80	14	0.16
Aumentada	12	0	
Anti TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)			
Sub- terapéutico	14	4	0.27
Terapéutico	64	10	
ADAs			
Negativos	60	12	0.36
Positivos	18	2	

Tabla 20. Asociación entre alelos, variables clínicas, Anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) y ADAs en pacientes con EAS.
Abreviaturas: P: valor p; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva; ADAs: Antibody Anti-Drugs.*
* Diferencias calculadas mediante prueba de Test de Fisher

4.1.3 Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, en pacientes con EAS

De los 55 pacientes con EAS, 19 estaban recibiendo Adalimumab y en promedio el nivel sérico fue de 7.30 µg/ml. Paralelamente19 recibieron Infliximab en los cuales el promedio a nivel sérico fue de 3.16 µg/ml. Por último, solo 8 estaban bajo tratamiento con Etanercept y en promedio el nivel sérico fue de 1.44 µg/ml.

Se cuantificaron en 10 individuos niveles positivos de anticuerpos ADAs para los grupos tratados con Adalimumab e Infliximab (5 pacientes en cada grupo). Adicionalmente, no fueron detectados anticuerpos ADAs en ninguno de los pacientes bajo tratamiento con Etanercept, tabla 21.

Fármaco Biológico*	Número (n)	%
Adalimumab		
Negativo	0	0
Nivel Sub-terapéutico	2	10.53
Nivel Terapéutico	17	89.47
Infliximab		
Nivel Sub-terapéutico	7	36.84
Nivel Terapéutico	12	63.16
Etanercept		
Nivel Sub-terapéutico	0	0
Nivel Terapéutico	8	100
ADAs*	**Número (n)**	**%**
Adalimumab		
Negativos	14	73.68
Positivos	5	26.32
Infliximab		
Negativos	14	73.68
Positivos	5	26.32
Etanercept		
Negativos	8	100
Positivos	0	0
Genotipo	**Número (n)**	%
G/G	48	87.5
A/G	7	12.7
Alelo	**Número**	%
G	103	93.6
A	7	6.3

Clasificación según el proveedor Promonitor® para cada fármaco biológico, G/G. Genotipo Silvestre; A/G: Genotipo mutante.
* Abreviatura ADAs: Anti-drug-antibodies.
Datos representados en valores de %.Ver valores de referencia para cada fármaco biológico en la metodología.
Tabla 21. Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, así como la frecuencia según los genotipos y alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con EAS.

4.1.4 Asociación entre los niveles séricos de anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con EAS

Los datos descriptivos planteados hasta el momento nos llevaron a realizar asociaciones estadísticas con respecto a los niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con EAS. Se encontró significancia estadística entre los niveles séricos de anti-TNF-α y el índice BASDAI con un valor p=0.045. Llama la

atención que el 45.65% de los pacientes con niveles séricos terapéuticos, presentaban índices de actividad de la enfermedad elevados mayores de 4 de BASFI y BASDAI.

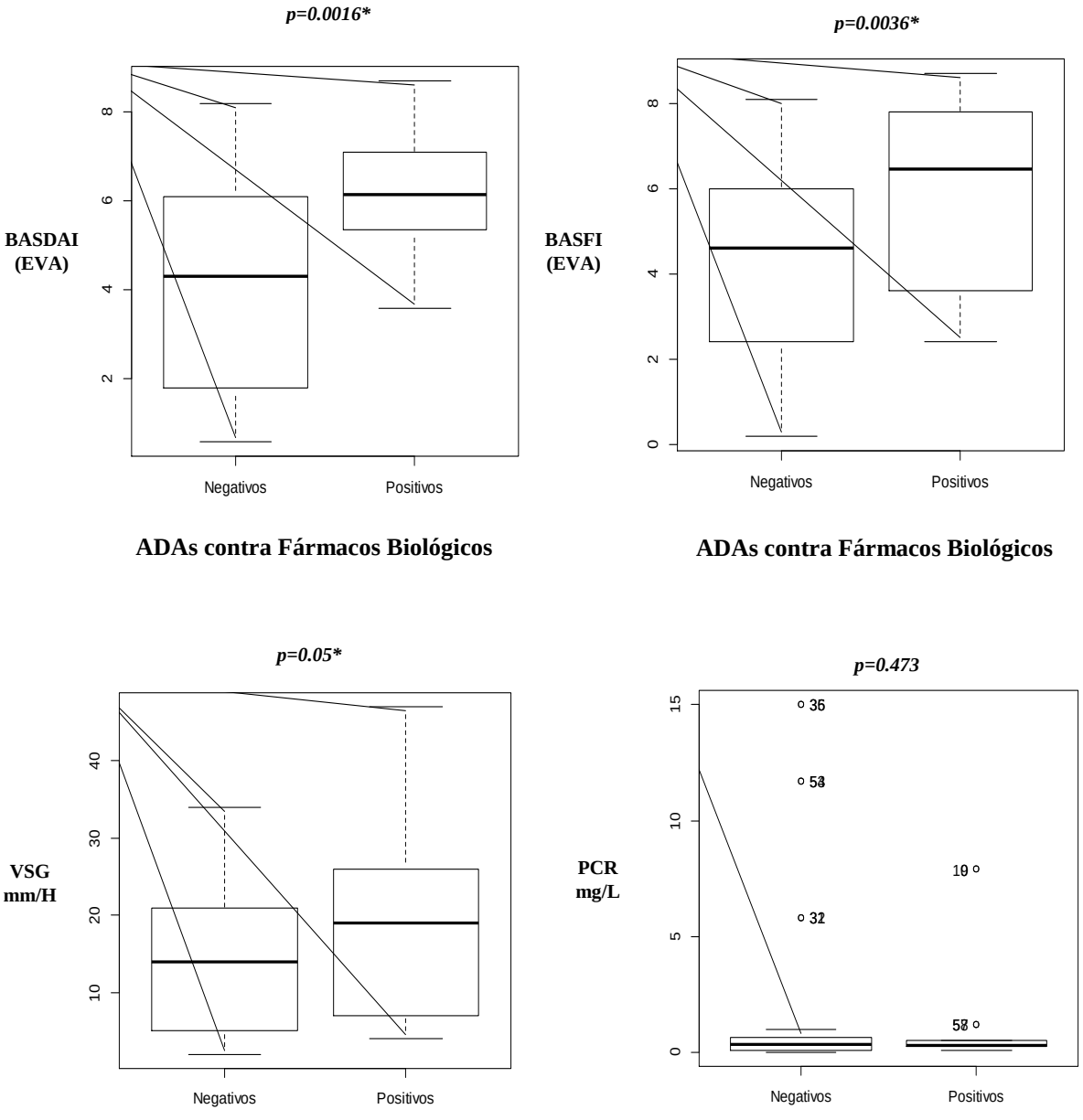
	Niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)		
Variable	**Sub-terapéuticos Mediana (Minimo-Máximo)**	**Terapéuticos Mediana(Minimo-Máximo)**	***p***
BASFI	5.3± (2.4-8.7)	4.7±(0.2-8.2)	0.169
BASDAI	5.5±(4.3-7.7)	4.4±(0.6-8.7)	0.045*
VSG	7±(2-47)	0.3±(2-34)	0.82
PCR	0.2±(0.09-7.9)	14±(0.03-15)	0.85

Abreviaturas: P: valor p; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASDAI Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva. Valor significativo $p<0.05$.

*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney, Clasificación del fármaco según el proveedor Promonitor®. Ver valores de referencia para las variables Anexo 3.

Tabla 22. Asociación entre los niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con EAS.

4.1.5 Asociación entre ADAs e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con EAS



Abreviaturas: P: valor p; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; ADAs: Antibody Anti-Drugs, VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C reactiva; EVA: Escala Visual Análoga, ADAs: Anti-drug-antibodies. Clasificación de ADAs según el proveedor Promonitor®

Figura 6. Diagrama de caja y bigote para la variable BASDAI, BASFI, VSG y PCR respecto a la concentración de ADAs contra fármacos Anti-TNF-α.

Se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre ADAs y los índices de actividad evaluados. Los pacientes positivos para ADAs tenían un status activo para la enfermedad (BASDAI $\bar{x}$= 6.1; *p*=0.0016), así como una categoría no funcional (BASFI $\bar{x}$=6.4; *p*=0.0036) y un valor de (VSG $\bar{x}$=19mm/h; *p*=0.05). No hubo diferencia para la variable (PCR $\bar{x}$: 0.3 mg/L; *p*=0.473).

4.1.6 Representación de resultados por biológico: Adalimumab

4.1.6.1 Asociación entre la presencia del SNP -308 TNF- α, y variables clínicas en pacientes con EAS en tratamiento con Adalimumab

Para ilustrar el comportamiento del SNP-308 del TNF-α, se hizo un análisis de asociación entre alelos y diversas variables: BASDAI, BASFI, concentración de Adalimumab, ADAs contra Adalimumab y HLA-B27.No se observó ninguna asociación estadísticamente significativa.

4.1.6.2 Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con los niveles séricos de PCR y VSG en pacientes en tratamiento con Adalimumab

Se realizó un análisis de asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con los niveles séricos de PCR y VSG en pacientes con EAS, por medio de la prueba estadística de U Mann Whitney, en la cual se presentó asociación entre el reactante de fase aguda PCR y la presencia del SNP-308 del TNF-α*p*=0.02. Es de recalcar que se encontraron los niveles normales de PCR en pacientes portadores del alelo silvestre G en comparación con el alelo mutante A, tabla 23.

	-308 TNF-α		***p***
	G n	**A n**	
PCR	53	3	0.02*
VSG	51	3	0.67

Abreviaturas: P: valor p; PCR: Proteína C Reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular. Valor significativo p<0.05.
*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney. Ver valores de referencia para PCR y VSG Ver Anexo 3.
Tabla 23. Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con los niveles séricos de PCR y VSG en pacientes con EAS.

4.1.6.3 Correlación entre el nivel sérico de Adalimumab y ADAs contra Adalimumab respecto al tratamiento antirreumático concomitante en pacientes con EAS

Otro aspecto importante a considerar fue el uso de fármacos antirreumáticos dentro del grupo de pacientes con EAS. Según los datos analizados, el más utilizado fue la sulfasalazina en 7 pacientes, seguido por el Metrotexato y la Prednisolona en 2 pacientes cada uno. Se obtuvo una correlación positiva débil entre el nivel sérico de Adalimumab y Metrotexato de 0.341 y un valor p=0.012. Respecto a la relación entre la presencia de ADAs para Adalimumab y el uso de DMARDs, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Entre los antecedentes clínicos analizados para los pacientes con EAS como hipertensión, diabetes, hipotiroidismo, enfermedad pulmonar, dislipidemia y tabaquismo activo y la concentración de Adalimumab, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas.

4.1.6.4 Correlación entre la concentración de Adalimumab, índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS

Se observó que correlación positiva débil entre Adalimumab y VSG con una relación negativa de -0.40 y un valor p=0.002; estos resultados se obtuvieron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Para ilustrar estos hallazgos, se hizo un gráfico de dispersión respecto a las variables Adalimumab vs. VSG, en el que los valores altos de VSG se correlacionan con niveles sub terapéuticos del fármaco en pacientes con EAS, lo cual muestra una correlación inversamente proporcional. Paralelamente, la línea de tendencia decreciente confirmó el supuesto de esta investigación; es decir, si el valor de la VSG aumenta, menor será la concentración de Adalimumab a nivel sérico, figura 7.

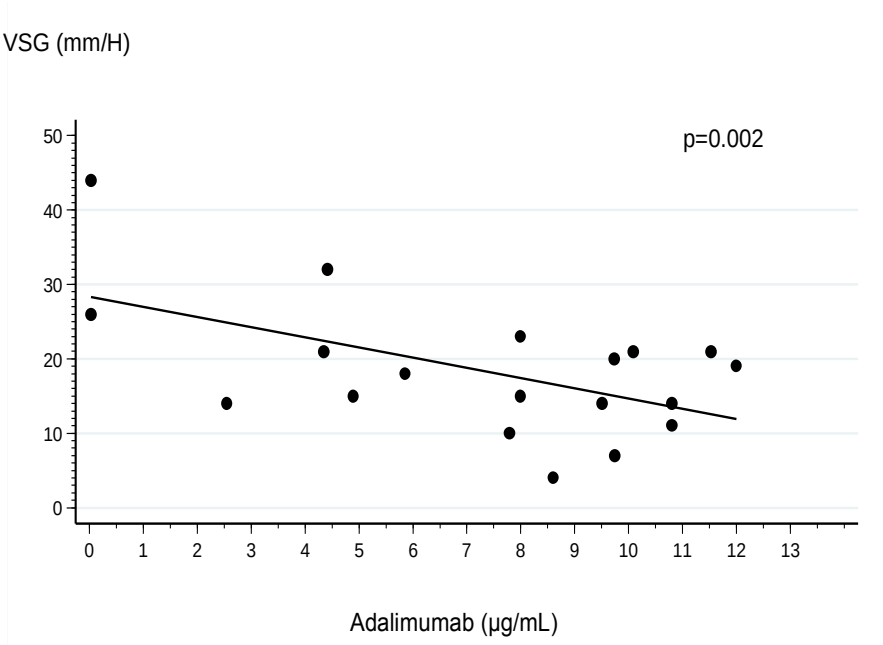


Figura 7. Gráfica de Dispersión, Adalimumab (µg/mL) Vs VSG (mm/H).

4.1.6.5 Correlación entre la concentración de ADAs contra Adalimumab: Índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS.

Paralelamente, se hizo un análisis de correlación entre la concentración de anticuerpos-anti-Adalimumab y los valores de BASDAI, presencia del alelo HLA-B27 y niveles de PCR, sin encontrar datos significativos. Sin embargo, sí hubo diferencias estadísticamente significativa por medio del coeficiente de Pearson entre ADAs contra Adalimumab y VSG con una relación positiva de 0.52 y un valor p=0.00005; así como para ADAs contra Adalimumab y BASFI con una relación positiva de 0.34 y un valor p=0.01, tabla 24.

En cuanto al diagrama de dispersión, la línea de tendencia creciente confirma que el nivel de VSG aumenta a medida que se incrementan los niveles de ADAs a nivel sérico, figura 8.

		BASDAI	BASFI	HLA-B27
ADAs contra Adalimumab	Coeficiente de Correlación de Pearson	0.14	0.34	-0.06
	p	0.29	0.01*	0.65
		PCR	**VSG**	
	Coeficiente de Correlación de Pearson	0.033	0.52	
	p	0.81	0.00005*	

Abreviaturas: P: valor p; BASDAI Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; HLA-B27: Antígeno Leucocitario humano B27; PCR: Proteína C Reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular.Valor significativo p<0.05. Ver valores de referencia Anexo 3.
* Coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 24. Correlación entre la concentración de ADAs contra Adalimumab: índices de actividad y función de la enfermedad, HLA-B27 y reactantes de fase aguda en pacientes con EAS.

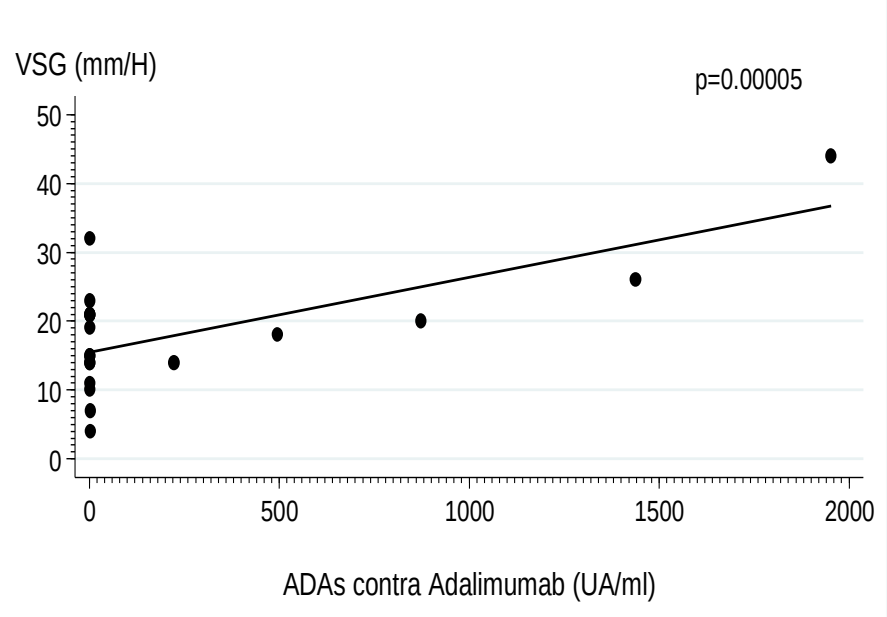


Figura 8. Gráfica de Dispersión ADAs contra Adalimumab (UA/mL) Vs VSG (mm/H).

4.1.7 REPRESENTACIÓN DE RESULTADOS POR BIOLÓGICO: INFLIXIMAB.

4.1.7.1 ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS, VARIABLES CLÍNICAS, NIVEL SÉRICO DE INFLIXIMAB Y ADAs CONTRA INFLIXIMAB EN PACIENTES CON EAS.

Con respecto al fármaco Infliximab no se encontraron asociaciones estadísticas entre genotipos con las variables clínicas planteadas.

4.1.7.2 Asociación entre el nivel sérico de Infliximab, ADAs e índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes con EAS

Posteriormente al realizar la asociación entre los niveles terapéuticos y sub-terapéuticos de Infliximab, se halló que aquellos pacientes con niveles sub-terapéuticos presentan índices de severidad elevados en BASDAI y BASFI con un valor de mediana de 5.5 y 5.9, respetivamente, tabla 25.

Paralelamente, la presencia de ADAs contra Infliximab en los pacientes con EAS, también reveló niveles elevados en los índices de BASDAI y BASFI mediana de 5.8 y 7.4, respectivamente, generando asociaciones estadísticamente significativas, tabla 25.

	INFLIXIMAB		
Variable	**Sub terapéutico (Minimo-Máximo)**	**Terapéutico (Minimo-Máximo)**	***p***
BASFI	5.9±(3.5-8.7)	3.9±(0.2-7)	0.0063*
BASDAI	5.5±(4.3-7.7)	4.3±(0.6-7.6)	0.043*
	ADAs contra Infliximab		
Variable	**Negativos (Minimo-Máximo)**	**Positivos (Minimo-Máximo)**	***p***
BASFI	4.5±(0.2-7)	7.4±(3.5-8.7)	0.016*
BASDAI	4.3±(0.6-7.6)	5.8±(5.3-7.7)	0.0029*

Abreviaturas: P: valor p; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index,ADAs: Anti-drug-antibodies Clasificación de Infliximab y ADAs contra Infliximab según el proveedor Promonitor®Ver valores de referencia Anexo 3.
* Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney.
Tabla 25. Asociación entre el nivel sérico de Infliximab, ADAs contra Infliximab, índices de actividad y función de la enfermedad en pacientes con EAS.

4.1.8 Representación de resultados por biológico: Etanercept

4.1.8.1 Asociación entre los niveles séricos de Etanercept, PCR y VSG en pacientes con EAS.

En lo que respecta a Etanercept, la única asociación estadísticamente significativa se halló entre los niveles séricos del fármaco y las variables PCR y VSG, en los que los pacientes con

niveles terapéuticos mantuvieron valores normales tanto para PCR como para VSG, *p*=0.027 y *p=0.*029, respectivamente.

4.2 Población de pacientes con Artritis Reumatoide

4.2.1 Características demográficas de los pacientes que cursan con artritis anti- TNF-α en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014)

La población de pacientes con AR tenían un promedio de edad cercano a los 60 años, con un tiempo de diagnóstico de 18 años; mientras que el promedio para el tiempo de tratamiento con terapia biológica fue alrededor de 31 meses. Adicionalmente, el grupo de pacientes con AR presentó un promedio en: DAS28PCR de 3.6; DAS28VSG de 4.0, CDAI de 15.54 y HAQ-DI de 0.83. Se observó que la mayor parte de los pacientes con AR eran del sexo femenino con niveles de PCR y VSG por encima de 3 mg/L y 20 mm/H, respectivamente, tabla 26.

n=56	Promedio	Mínimo	Máximo	DS
Edad (años)	60.51	32	82	11.13
Tiempo del Dx (años)	18.90	1	70	15.38
Tiempo de Terapia Biológica (meses)	31.55	0	144	29.89
DAS28PCR	3.66	1.5	8.8	1.52
DAS28VSG	4.02	1.81	8.55	1.49
CDAI	15.54	0	68	13.07
HAQ-DI	0.83	0	5.3	1.16
Variable	**Número (n)**			**%**
Sexo				
Hombre/Mujer	8/48			14/86
PCR(mg/L)				
>3mg/L	37/18			67/33
VSG				
>20mm/H	26/23			54/46

Abreviaturas: DS Desviación estandar; DAS28: Disease Activity Score in 28 Joints; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: The Health Assessment Questionnaire; PCR: Proteína C reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular Datos representados en valores de %. Valores de referencia de PCR, VSG (Ver valores de referencia, Anexo 3).

Tabla 26. Características demográficas de los pacientes que cursan con AR en el Hospital Militar Central, Bogotá (2012-2014).

De un total de 56 pacientes con AR, 25 estaban recibiendo Adalimumab, 10pacientes estaban recibiendo Infliximab, y por último 13 estaban bajo tratamiento con Etanercept. De esta población, el 21% (n=12/56) había recibido biológico previo y cambiaron por haber presentado falla terapéutica; sumado a lo anterior, solo un paciente manifestó haber recibido dos biológicos previos al tratamiento actual.

En cuanto a los antecedentes clínicos y la distribución de comorbilidades en la población de pacientes con AR se encontró: Hipotiroidismo en un 19.6%, Hipertensión en un 30.35%, Diabetes en un 8.92%, Enfermedad Pulmonar en un 7.14%, Dislipidemia en un 17.85%, Cardiopatía en un 7.14%. En el momento del estudio, solo dos pacientes eran fumadores activos 3.5% y un 28.57% refirió historia de tabaquismo.

4.2.2 Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs en pacientes con AR

De un total de 56 pacientes con AR, 25 estaban recibiendo Adalimumab con nivel sérico promedio de 5.90 µg/ml; 10pacientes estaban recibiendo Infliximab y en promedio el nivel sérico fue de 0.86 µg/ml. Además, 13 pacientes estaban bajo tratamiento con Etanercept en un rango de concentración sérica de 1.46 µg/ml. Ver rangos terapéuticos en metodología.

En contraste, se cuantificó en 9 pacientes niveles de anticuerpos positivos para Adalimumab e Infliximab (5 y 4 pacientes respetivamente) y ningún paciente con Etanercept presentó ADAs.

El genotipo silvestre G/G estuvo presente en 48 pacientes que corresponde al 85.7%, mientras que el genotipo mutante A/G se identificó en 8 pacientes que corresponde al 14.2% y no se identificaron sujetos homocigotos A/A, Tabla 27.

Fármaco Biológico*	Número	%
Adalimumab		
Negativo	2	7.41
Nivel Subterapéutico	5	18.52
Nivel Terapéutico	18	74.07
Infliximab		
Nivel Subterapéutico	4	40
Nivel Terapéutico	6	60
Etanercept		
Nivel Subterapéutico	0	0
Nivel Terapéutico	13	100
ADAs*	**Número**	**%**
Adalimumab		
Negativos	20	80
Positivos	5	20
Infliximab		
Negativos	6	60
Positivos	4	40
Etanercept		
Negativos	13	100
Positivos	0	0
Genotipo	**Número**	**%**
G/G	48	85.71
A/G	8	14.29
Alelo	**Número**	**%**
G	104	97.32
A	8	2.68

*Clasificación según el proveedor Promonitor® para cada fármaco biológico, G/G. Genotipo Silvestre; A/G: Genotipo mutante. Datos representados en valores de %.

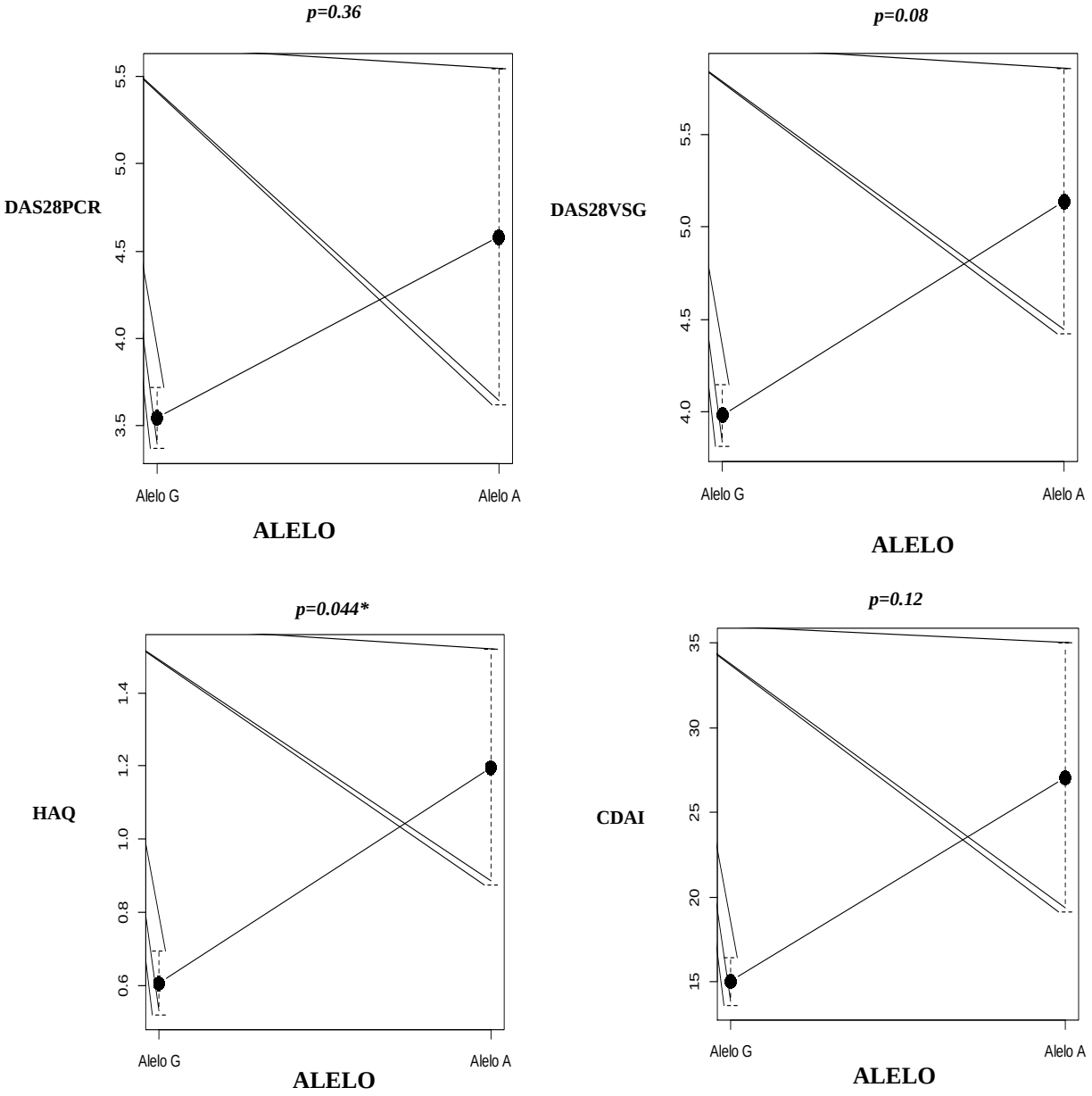
Tabla 27. Niveles séricos de Adalimumab, Infliximab, Etanercept y ADAs, así como la frecuencia según los genotipos y alelos del SNP-308 del TNF-α en pacientes con AR.

4.2.3 Asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α variables clínicas en pacientes con AR.

Se realizó un análisis de asociación entre alelos del SNP-308 del TNF-α con las variables clínicas en pacientes con AR, por medio de la prueba estadística de U Mann Whitney.

De modo accesorio, se presentan los siguientes plots de medias, los cuales incorporan las variables DAS28VSG, DAS28PCR, HAQ y CDAI en el grupo general de pacientes con AR respecto a los alelos identificados, en los que solo se encontró asociación entre el HAQ y la presencia del SNP-308 del TNF-α (alelo G: $\overline{x}$= 0.61±DS 0.75 y alelo A: $\overline{x}$=1.19± DS 0.91) con

un valor *p*=0.044. Pero no se encontró diferencias con respecto a las variables DAS28VSG, DAS28PCR y CDAI, figura 9.



Abreviaturas: P:valor p; DAS28:Disease Activity Score in 28 Joints; HAQ:The Health Assessment Questionnaire; CDAI: Clinical Disease Activity Index; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva. Valor significativo p<0.05. Ver valores de referencia Anexo 3.
*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney.

Figura 9. Plots de medias para las variables DAS28VSG, DAS28PCR, HAQ, CDAI respecto al alelo G y A en pacientes con AR**.**

Paralelamente se hizo un análisis entre la presencia del genotipo (G/G y A/G), alelos (A y G), algunas variables de estudio, sin encontrar ningún tipo de asociación.

Variable	G/G n	A/G n	*p*
DAS28VSG			
Activo	26	7	0.91
No activo	14	2	
DAS28PCR			
Activo	19	4	0.08
No activo	21	4	
VSG			
Normal	20	3	0.47
Aumentada	20	6	
PCR			
Normal	31	5	0.29
Aumentada	13	3	
Anti TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)			
Sub- terapéutico	5	1	0.68
Terapéutico	34	8	
ADAs			
Negativos	32	6	0.48
Positivos	7	2	

Tabla 28. Asociación entre genotipos, variables clínicas, Anti- TNF-α y ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) en pacientes con AR.
Abreviaturas: P:valor p; DAS28:Disease Activity Score in 28 Joints; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva; ADAs: Antibody Anti-Drugs.
* Diferencias calculadas mediante prueba de Test de Fisher.

Variable	G n	A n	*p*
DAS28VSG			
Activo	61	7	0.82
No activo	28	1	
DAS28PCR			
Activo	44	4	0.15
No activo	44	3	
VSG			
Normal	41	2	0.22
Aumentada	48	6	
PCR			
Normal	65	4	0.42
Aumentada	31	3	
Anti TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)			
Sub- terapéutico	10	2	0.26
Terapéutico	77	6	
ADAs			
Negativos	72	4	0.11
Positivos	14	3	

Tabla 29. Asociación entre alelos, variables clínicas, Anti- TNF-α y ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) en pacientes con AR.
Abreviaturas: P:valor p; DAS28:Disease Activity Score in 28 Joints; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva; ADAs: Antibody Anti-Drugs.
* Diferencias calculadas mediante prueba de Test de Fisher.

4.2.4 Asociación entre los niveles séricos de anti- TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con AR

Posteriormente, al realizar el análisis de asociación entre algunas variables de la enfermedad, se encontró que DAS28 para PCR y VSG fueron estadísticamente significativas, así como la variable PCR. Sin embargo, los pacientes con niveles terapéuticos tenían índices elevados de DAS28 para PCR y VSG, aun cuando mantenían niveles óptimos para cada uno de los fármacos biológicos evaluados, Tabla 30.

	Niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept)		
Variable	**Sub-terapéuticos (Minimo-Máximo)**	**Terapéuticos (Minimo-Máximo)**	***p***
DAS28VSG	5.77±(3.33-6.85)	3.63±(1.81-8.55)	**0.007***
DAS28PCR	6.06±(3.15-6.49)	3.02±(1.5-8.84)	**0.005***
VSG	28±(9-83)	23±(3-90)	0.408
PCR	10.62±(0.22-77.2)	0.72±(0.014-99.8)	**0.05***

Abreviaturas: P: valor p; DAS28: DiseaseActivity Score in 28 Joint; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva, Clasificación de fármacos Anti-TNF-α según el proveedor Promonitor®. Valor significativo p<0.05. Ver valores de referencia tabla Anexo 3.
*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney

Tabla 30. Asociación entre los niveles séricos de Anti-TNF-α (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad en pacientes con AR.

4.2.5 ASOCIACIÓN ENTRE ADAs E ÍNDICES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDADEN PACIENTES CON AR.

Paralelamente se observó asociaciones estadísticamente significativas entre ADAs y DAS28VSG, CDAI y mediciones clínicas como NAD en el grupo de pacientes con AR. No hubo diferencias estadísticamente significativas para DAS28PCR y NAI.

	ADAs		
Variable	**Negativos (Minimo-Máximo)**	**Positivos (Minimo-Máximo)**	***p***
DAS28VSG	3.6±(1.81-8.55)	4.99±(2.75-6.85)	**0.018*** **0.028****
DAS28PCR	3.02±(1.5-8.84)	3.8±(1.86-6.49)	0.119
CDAI	11±(0-68)	21±(8-39.5)	**0.015***
NAD	2±(0-26)	8±(0-21)	**0.003***

Abreviaturas: P: valor p; DAS28: DiseaseActivity Score in 28 Joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; NAD: Número de Articulaciones Dolorosas; ADAs: Antibody Anti-Drugs. Clasificación de ADAs según el proveedor Promonitor®Valor significativo p<0.05.Ver valores de referencia Anexo 3.
*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney
** Diferencias calculadas mediante prueba de Test de Fisher.

Tabla 31. Asociación entre la presencia y/o ausencia de ADAs (Adalimumab, Infliximab y Etanercept) e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con AR.

4.2.6 Representación de resultados por biológico: Adalimumab

4.2.6.1 Asociación entre SNP -308 TNF-α, variables clínicas en pacientes con AR y en tratamiento con Adalimumab

En referencia al Adalimumab, se hizo un análisis de asociación entre alelos y variables clínicas para los pacientes con AR. No se observó ninguna asociación estadísticamente significativa.

4.2.6.2 Correlación entre el nivel sérico de Adalimumab, tratamiento antirreumático concomitante y antimalárico en pacientes con AR

En lo que respecta al uso de fármacos antirreumáticos como tratamiento concomitante, cabe señalar que el más utilizado en los pacientes con AR fue el metrotexato en 15 pacientes, seguido por la leflunomida en 12 pacientes, la prednisolona en 3 pacientes y la cloroquina en 3 pacientes.

Se encontraron diferencias estadísticamentesignificativas por medio del coeficiente de Pearson entre Adalimumab-sulfasalazina y Adalimumab-Cloroquina, obteniendo una relación positiva débil de 0.59,p=0.0005 y 0.49,p=0.005 respectivamente.

4.2.6.3 Correlación entre la concentración de Adalimumab y ciertos antecedentes clínicos en pacientes que cursan con AR

Al analizar la correlación entre variables clínicas y los niveles de Adalimumab solo se encontró un valor débil entre el DAS28VSG con un valor para el Coeficiente de Correlacion de Pearson= -0.30 y $p= 0.01$, mientras que para las variablesarticulaciones dolorosas, inflamadas, CDAI, HAQ, PCR y VSG no se hallaron datos estadisticamente significativos.

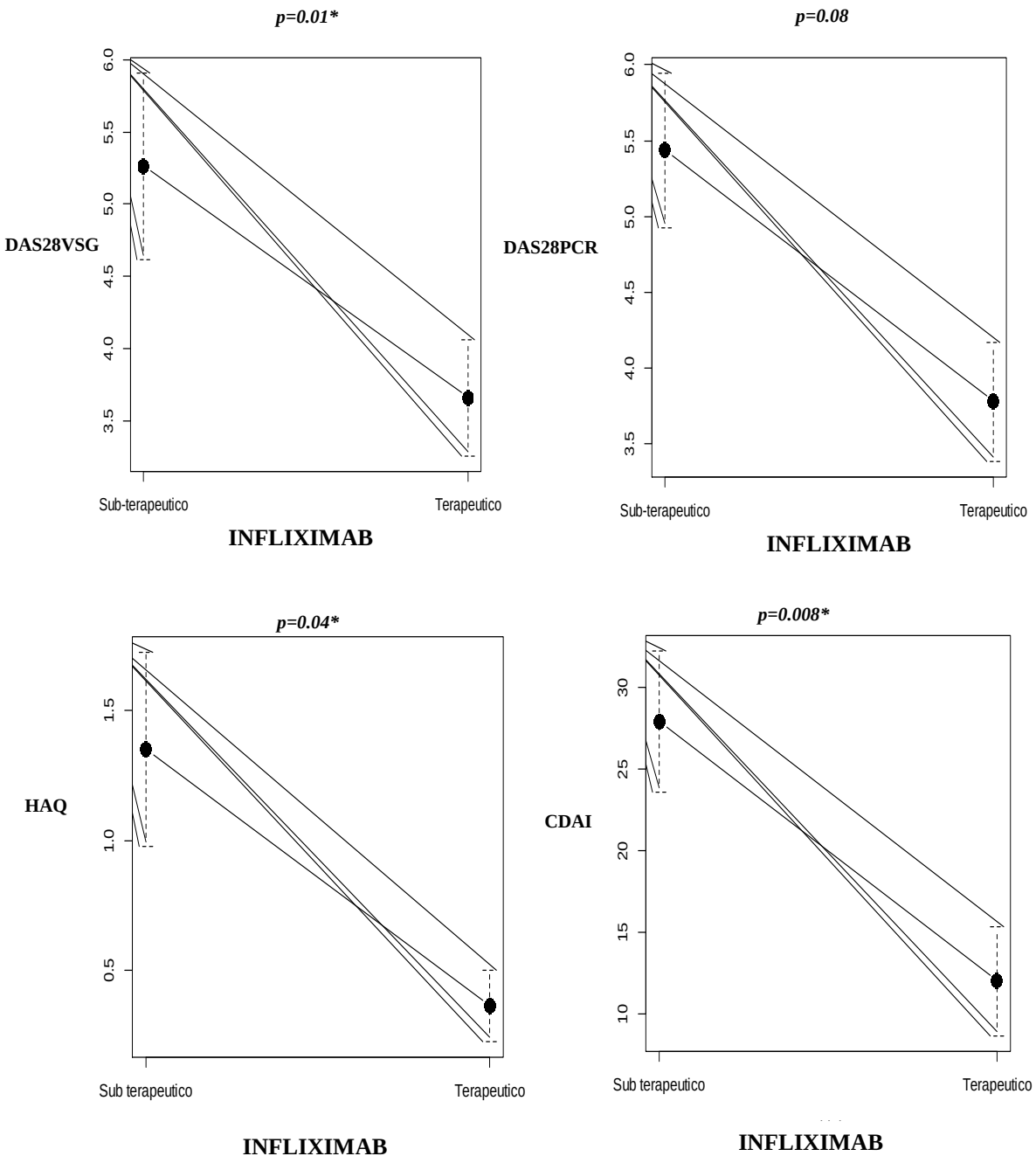
4.2.7 Representación de resultados por biológico: Infliximab

4.2.7.1 Asociación entre genotipos, variables clínicas, nivel sérico de Infliximab y ADAS contra Infliximab en pacientes con AR

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre alelos, variables clínicas, nivel sérico de Infliximab y ADAs contra Infliximab en pacientes con AR.

4.2.7.2 Asociación entre los niveles séricos de Infliximab e índices de actividad en pacientes con AR

Se encontraron valores estadisticamente significativos entre los niveles de Infliximab y los indices DAS28VSG (sub-terapéutico $\bar{x}$=5.43±DS 1.43 y terapéutico $\bar{x}$=3.77±DS 1.36) p=0.01; HAQ (sub-terapéutico$\bar{x}$=1.35±DS 1.05 y terapéutico $\bar{x}$=0.36± 0.43)p=0.04y CDAI (sub-terapéutico $\bar{x}$=27.87±DS 12.23 y terapéutico $\bar{x}$= 12±DS 11.59) p=0.008, aunque no se encontraron diferencias respecto a DAS28PCR.



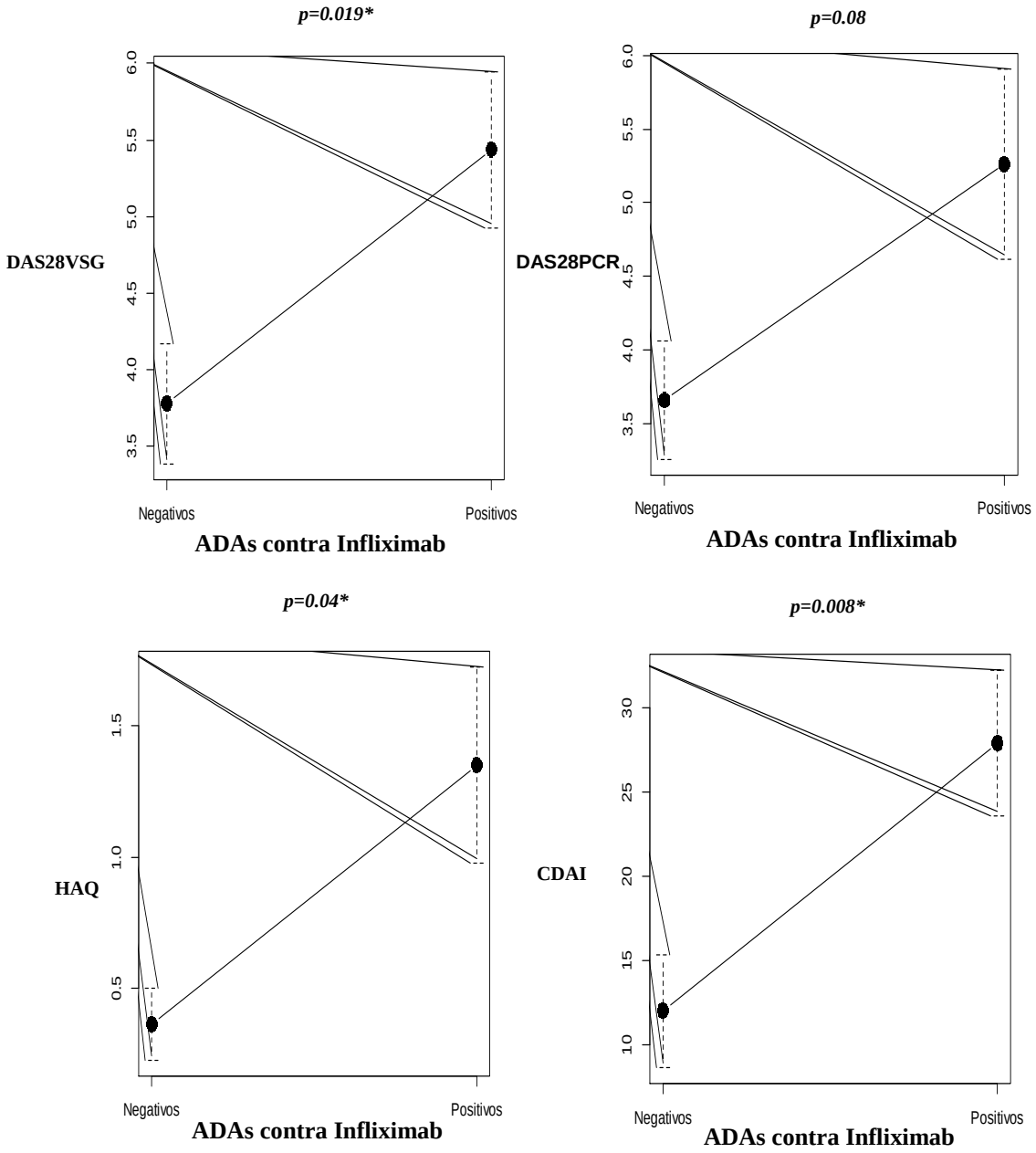
Abreviaturas: P: valor p; DAS28: Disease Activity Score in 28 Joint; HAQ: The Health Assessment Questionnaire; CDAI: CDAI: Clinical Disease Activity Index, VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C Reactiva. Clasificación de Infliximab según el proveedor Promonitor®. Valor significativo $p<0.05$. Ver valores de referencia anexo 3.

*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney.

Figura 10. Plots de medias entre los niveles de Infliximab respecto al índice DAS28 por VSG y PCR, HAQ y CDAI en pacientes con AR.

4.2.7.3 Asociación entre la concentración de ADAs contra Infliximab e índices de actividad de la enfermedad en pacientes con AR

Para finalizar, los pacientes con ADAs positivos tenían índices elevados comparados con aquellos que tenían ADAs negativos. La asociación entre ADAs contra Infliximab arrojó diferencias estadísticamente significativas respecto a las variables DAS28VSG (negativos $\bar{x}$=3.77±DS 1.36 y positivos $\bar{x}$=5.43±DS 1.43) p=0.019; HAQ (negativo $\bar{x}$= 0.36±DS 0.43 y positivo $\bar{x}$=1.35±DS 1.05) p=0.04 y CDAI (negativo $\bar{x}$=12±DS 11.59 y positivo $\bar{x}$=27.8 ±DS 12.23) p=0.008. No hubo diferencias para DAS28PCR, Figura 11.



Abreviaturas: P: valor p; DAS28: Disease Activity Score in 28 Joint; HAQ: The Health Assessment Questionnaire; CDAI: Clinical Disease Activity Index; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PCR: Proteína C reactiva; Clasificación de ADAs según el proveedor Promonitor®. ADAs: Anti-drug-antibodies. Valor significativo. p<0.05.Ver valores de referencia Anexo 3.

*Diferencias calculadas por prueba de U Mann Whitney.

Figura 11. Plot de medias entre los niveles de ADAs contra Infliximabrespecto al índice DAS28 por VSG y PCR, HAQ y CDAI en pacientes con AR.

4.2.8 Representación de resultados por biológico Etanercept

Cabe destacar que toda la población de pacientes en tratamiento con Etanercept tenía niveles óptimos y ADAs negativos, razón por la cual no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de medicamento o ADAS y alelos, genotipos y las variables clínicas incluidas en el estudio.

5. Discusión y recomendaciones.

Las Espondiloartritis son un grupo de enfermedades reumatológicas crónicas e inflamatorias, cuyo diagnóstico es frecuentemente tardío. Su curso evolutivo es progresivo, con el consecuente deterioro funcional y discapacidad, con compromiso articular que conlleva a la disminución en la calidad de vida con un alto impacto socioeconómico (107).

Los pocos estudios histológicos realizados en humanos sugieren el predominio de los linfocitos T $CD8^+$ y macrófagos, así como la expresión de TNF-α, en las áreas afectadas. Análogamente, algunos individuos responden eficazmente al tratamiento anti-TNF-α y este hallazgo demuestra que esta citocina participa de forma relevante en la fisiopatología de las EAS (108).

El TNF-α ejerce su efecto mediante unión a los receptores TNFR1 y TNFR2 ubicados en la superficie celular, induciendo vías de transducción de señal que activan el factor nuclear NF-kB. Cuando el NF-kB activo entra en el núcleo de la célula, induce la transcripción de genes que codifican proteínas asociadas a inflamación (109).

Por lo tanto, el TNF-α es una molécula inmunomediadora y proinflamatoria de ciertas enfermedades reumáticas, cuya producción puede ser baja o alta entre humanos, Van der liden et al, respaldo la posible influencia de variaciones genéticas sobre la regulación de los niveles en circulación de TNF-α (110) . Además, la localización del gen de *tnf-α* dentro del CMH, ha

planteado la posibilidad que polimorfismos dentro de este locus pudieran contribuir a la patogénesis de una gran variedad de enfermedades autoinmunes (111).

La asociación entre la transición de Guanina a Adenina en la región promotora -308 de este gen ha sido investigada intensamente. Los resultados son contradictorios y algunos investigadores plantean al SNP-308 como un marcador de severidad de la enfermedad y de respuesta al tratamiento (99, 112).

En México se llevó a cabo un análisis de dos polimorfismos en las posiciones -238 y -308 del gen *tnf-α*, en los que se observó un incremento en la frecuencia del alelo T2(A) en el grupo de pacientes con EAS y del genotipo T2T1 (A/G) en pacientes con EASI, luego de que ambos grupos fueran comparados con controles sanos. Con base en estos resultados, los autores proponen al TNF-α como un posible marcador de susceptibilidad para las EAS (77).

Un estudio llevado a cabo en Colombia, sugiere que el alelo -308A del TNF-α no ejerce un efecto protector en pacientes con EAS, lo que podría apoyar la hipótesis de que éste podría ser considerado como un factor de susceptibilidad (6, 77). Cabe señalar que los resultados previos en población colombiana evaluaron al SNP -308 del TNF-α en un grupo de pacientes con EAS por subtipos, pero caso contrario al trabajo aquí presentado, el tratamiento con fármacos Anti-TNF-α fue criterio de exclusión. En el reporte de Romero et al., predominó la presencia de manifestaciones periféricas en pacientes con diagnóstico de ARe y EASI en el momento de la toma de la muestra y el registro de los índices clínicos, siendo la población de ARe la que se asoció con la presencia del alelo polimórfico (6). Vale la pena destacar que el grupo de pacientes en el presente estudio estuvo constituido por el 43 % con formas axiales desde el inicio de la enfermedad y el 11 % de los individuos fueron diagnosticados inicialmente como ARe, pero en la actualidad están clasificados como EA.

Por otro lado, Ji et al., proponen una participación limitada del SNP-308 del TNF-α como indicador de actividad para la EA, el subtipo más común dentro de las EAS (79).

Los resultados obtenidos al comparar tanto genotipos como alelos del SNP-308 del TNF-α con la presencia o no de la enfermedad, no generaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados son compatibles con los hallazgos en una población portuguesa de pacientes con EA, en la que se encontró una baja presencia del alelo A comparado con el grupo control, por lo que se plantea una baja influencia de este alelo con respecto a la susceptibilidad y pronóstico de la EA (113). Así mismo, otro trabajo puso de manifiesto la falta de asociación entre la EA con respecto a la presencia del alelo A, ya que éste solo fue detectado en el 12.1% de 33 pacientes con EA/$B27^+$ y 4.6% de 33 pacientes con EA/$B27^-$ con respecto al 5.3% de 19 controles $B27^+$ y el 8.3% de 18 controles $B27^-$ (114).

Por otro lado, las opciones terapéuticas para los pacientes con EAS habían sido limitadas hasta la última década, pero la reciente introducción de agentes bloqueadores del TNF-α ha permitido el manejo óptimo de esta población. En el año 2006, se llevó a cabo un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo con el propósito de evaluar la eficacia del Adalimumab en pacientes con EA (40). Allí observaron que el 58.2% de los pacientes, es decir 121 de 208, respondieron satisfactoriamente en comparación con aquellos que recibieron placebo. Conviene señalar que el 89% de los pacientes con EA y tratados con Adalimumab tenían niveles óptimos del medicamento.

Otro estudio evaluó el uso de Infliximab en 52 pacientes con EA que completaron 102 semanas de tratamiento y los resultados mostraron que el 58% de los pacientes alcanzaron al menos el 50% de mejora, tomando como referencia el valor basal en la puntuación BASDAI en la semana final (115). Adicionalmente, se observó que el 50% de los pacientes tenían un índice activo de la enfermedad (BASDAI: >4) comparado con concentraciones plasmáticas del fármaco

en niveles terapéuticos, por lo cual sería difícil asumir a esta variable como un criterio definitivo para ponderar la efectividad del tratamiento. De aquí la necesidad de exponer actualmente otras variables de actividad clínica como el ASDAS (en inglés, *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*) PCR y ASDAS VSG que determinen la eficacia de ciertos fármacos biológicos.

Ya que la intención de algunas investigaciones ha sido ajustar los criterios con respecto a predictores de respuesta al tratamiento, el índice BASDAI solo o combinado con otras variables (PCR, VSG, BASFI, rigidez matutina, entre otros) era para ese momento la medida más importante dentro de algunos ensayos clínicos para la evaluación de la actividad de la enfermedad y el manejo de los fármacos biológicos (116). Al respecto, tanto la PCR como la VSG, considerados biomarcadores serológicos de actividad en las EAS fueron relevantes en nuestro estudio al ser contrastados con la concentración de Etanercept (117, 118).

Un estudio realizado en 155 pacientes con EA y tratados con Infliximab (n=38) y Etanercept (n=117) describió que tanto la PCR como la VSG tenían asociación con el nivel de actividad de la enfermedad a los tres meses de tratamiento. Por lo tanto, estos marcadores inflamatorios podrían facilitar el seguimiento de la eficacia de tratamientos anti-TNF-α en pacientes con EA (119). De igual manera, los resultados de la concentración de Adalimumab disminuidos se asocian a elevaciones de la VSG en los pacientes con EAS.

Por otro lado, el efecto de la coadministración de DMARDs con respecto a los inhibidores del TNF-α en los individuos con EAS no ha sido completamente dilucidado. El uso limitado de DMARDs en ciertos casos no genera efectividad en cuanto a las manifestaciones axiales, y no hay evidencias que indiquen un mejor resultado si el uso de algún inhibidor anti-TNF-α es aplicado en combinación con algún DMARDs (120).

Aun así, en nuestro estudio se observó una correlación estadísticamente significativa entre la respuesta clínica favorable y el uso de una terapia combinada en el grupo de pacientes con

EAS tratados con Adalimumab en combinación con MTX, lo cual podría ser explicado en términos de la actividad sinérgica anti-proliferativa que pueden ejercer estos fármacos, impulsando de esta manera la inmunosupresión y afectando ciertas variables clínicas, además de evitar la generación de inmunogenicidad.

A pesar de la seguridad que pueden tener los bloqueadores del TNF-α, aún sigue siendo necesaria la búsqueda de respuestas con respecto a los pacientes que se mantienen en una etapa refractaria al tratamiento. En consecuencia, la farmacogenética ha tratado de evaluar el efecto de la variabilidad genética de un individuo en su respuesta a determinados fármacos.

Recientemente, un metaanálisis determinó que los pacientes con EAS y EII portadores del alelo silvestre, ya sea para el SNP-308 o para el -857 del gen *tnf-α* tenían una mejor capacidad de respuesta a los bloqueadores del TNF-α en comparación con los pacientes portadores del alelo polimórfico (80). En este sentido, los resultados obtenidos demostraron diferencias significativas entre la presencia del alelo G en los pacientes con EAS y en tratamiento con Adalimumab al comparar los niveles de PCR, los cuales se mantuvieron en niveles normales para los pacientes portadores de esté alelo. Sin embargo, este comportamiento no se observó en los pacientes tratados con Infliximab y Etanercept.

Por otro lado, la ARes una enfermedad inflamatoria crónica que afecta principalmente a la membrana sinovial, el cartílago y el hueso, donde el TNF-α es una de las moléculas clave en la patogénesis. El estudio del SNP-308, al igual que en las EAS, ha permitido inferir en el comportamiento de esta citocina frente a la enfermedad y al tratamiento con terapia biológica.

Posteriormente, un estudio de cohorte en una población argentina de 223 pacientes con AR y 111 controles sanos, planteó la falta de correlación no solo para el genotipo sino también para la frecuencia alélica de este polimorfismo con respecto al desarrollo o progresión de la enfermedad (121). De igual forma, en esta investigación, al examinar la frecuencia del

polimorfismo -308 del promotor del gen *tnf-α* en los 56 pacientes con AR y 155 controles, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas para genotipos y alelos entre estos dos grupos.

No obstante, al asociar el polimorfismo con variables de actividad y evaluación funcional, se observó significancia entre la presencia del alelo A en pacientes con AR y el aumento en el índice HAQ-DI, a diferencia de las variables de actividad DAS28 por VSG y PCR que no fueron estadísticamente significativas, pero que registraron una tendencia al aumento en relación a los pacientes que portan el alelo A. Posiblemente influya el tamaño de la muestra.

Por otro lado, un metaanálisis que reunió 15 estudios y 2127 pacientes propuso que los individuos portadores del alelo G tienen mejor respuesta al tratamiento, evaluada con respecto al índice DAS28 (122).Sin embargo, en pacientes mexicanos que cursaban con AR, se propuso al alelo (A)-308T2 como un marcador de severidad, teniendo en cuenta algunas variables como: HAQ-DI, erosiones y manifestaciones extra articulares (123).

Seitz et al. (2007) expuso que el genotipo G/G en pacientes con AR, APs y EA generaba una mejor respuesta al tratamiento anti-TNF-α que aquellos con el genotipo A/G y A/A, independientemente de la enfermedad reumática tratada. Por lo tanto, este planteamiento podría estar relacionado con nuestros hallazgos que describen que el 77% y 66% de los pacientes con AR y EAS, respectivamente, que recibieron alguno de los tres fármacos biológicos, eran portadores del genotipo G/G y mantuvieron concentraciones óptimas del medicamento (1).

Por otro lado, la adición de un DMARDs al tratamiento con bloqueadores del TNF-α ha demostrado ser efectivo en la reducción sostenida de los síntomas y esta propuesta fue planteada dentro de las recomendaciones del EULAR (en inglés, *The European League Against Rheumatism*) en el año 2010 (124). Sumado a lo anterior, se observó que el grupo de pacientes con AR tratados con Infliximab y en tratamiento concomitante con Sulfozalazina o Cloroquina, mostraron niveles óptimos del biológico.

La prevalencia de ADAs varía entre estudios de fármacos anti-TNF-α y estas observaciones podrían ser explicadas por las diferencias entre grupos de pacientes, por contraste en cuanto al tratamiento concomitante, la vía de administración, la dosificación del medicamento, el tipo de proteínay además la elección del ensayo para la detección de ADAs.

En este estudio, la terapia biológica con Infliximab reveló falta de eficacia en pacientes con EAS y AR conservando índices activos de la enfermedad debido a una respuesta desencadenada por el agente biológico, lo que resultó en la formación de ADAs. Por lo tanto, la inmunogenicidad es uno de los mecanismos detrás de la falla al tratamiento, tal como lo expone un estudio realizado en Francia en 108 pacientes: (17 con AR y 91 con EAS) donde se propone que altas concentraciones de Infliximab durante el inicio del tratamiento reduciría el desarrollo de ADAs (125, 126). Análogamente el Infliximab es un anticuerpo quimérico 25% murino que puede inducir la secreción de HACAS y de esta manera permitir reacciones adversas o pérdida de la eficacia.

Se ha documentado que la ausencia de ADAs en los pacientes con AR y en tratamiento con Adalimumab pudo deberse al uso de tratamiento concomitante que facilitaría el mantenimiento sostenido del medicamento (127, 128).Sin embargo, los pacientes con EAS tratados con Adalimumab presentaron asociación con respecto a la presencia de ADAs, concentraciones disminuidas del medicamento se detectaron en sujetos con ADAs positivos. Un estudio de cohorte observacional en 115 pacientes con EA tratados con Adalimumab por 24 semanas, describe que el 27% de la población presentó ADAs detectables y niveles de Adalimumab disminuidos. Además, la PCR y VSG se mantuvieron elevadas durante las 24 semanas de seguimiento en estos pacientes(129).

Finalmente, un estudio reciente identificó que pacientes con AR y tratados con Adalimumab tenían mejor respuesta al tratamiento y remisión de la enfermedad comparados con

Infliximab, aunque los tratados con Etanercept tenían la tasa de supervivencia más larga con respecto al fármaco (130). Estos hallazgos podrían ser extrapolados a nuestro estudio ya que los pacientes tratados con Infliximab para ambas patologías presentaron una asociación entre la presencia de ADAs y una baja respuesta al tratamiento.

Se recomienda la realización de otra fase del estudio con un número mayor de pacientes para establecer relaciones estadísticas más fuertes, así como el uso de otro método de detección para ADAs que revele la capacidad neutralizante del constructo de anticuerpos anti-TNF-α, ya que niveles elevados para ciertos biológicos por ELISA pueden ser erróneamente interpretados como "terapéuticos" a pesar de observar una actividad insuficiente por parte del fármaco biológico presente en circulación representado por niveles sostenidos en los índices de actividad y disfunción de la enfermedad.

6. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados del análisis del polimorfismo del SNP-308 del TNF-α para la presencia del alelo G en pacientes con EAS bajo tratamiento con terapia biológica anti TNF sugieren una mejor respuesta basados en los niveles de marcadores séricos como la PCR. En el grupo de pacientes con AR, el alelo A podría estar asociado con mayores índices de actividad y de disfunción.

Los niveles bajos de medicamento anti-TNF como la presencia de ADAs en sangre se correlacionaron con mayor actividad de la enfermedad tanto por índices clínicos como por marcadores serológicos de inflamación en los pacientes con EAS y AR. La combinación de Metrotexato con Adalimumab en pacientes con EAS se asoció con mayor biodisponibilidad del fármaco anti-TNF-α, así como la Sulfazalazina o la Cloroquina con Adalimumab en pacientes con AR. y finalmente, el Etanercept fue el medicamento menos inmunogénico comparado con otros agentes bloqueadores de anti TNF.

Se recomienda la realización de otra fase del estudio con un número mayor de pacientes para establecer relaciones estadísticas más fuertes, así como el uso de otro método de detección para ADAs que revele la capacidad neutralizante del constructo de anticuerpos anti-TNF-α, ya que niveles elevados para ciertos biológicos por ELISA pueden ser erróneamente interpretados como “terapéuticos” a pesar de observar una actividad insuficiente por parte del fármaco biológico presente en circulación representado por niveles sostenidos en los índices de actividad y disfunción de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Seitz M, Wirthmuller U, Moller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. Rheumatology (Oxford). 46. England2007. p. 93-6.
2. Manolova I, Ivanova M, Stoilov R, Rashkov R, Stanilova S. Association of single nucleotide polymorphism at position− 308 of the tumor necrosis factor-alpha gene with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2014;28(6):1108-14.
3. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. Scand J Immunol. 1996;43(4):456-63.
4. Murdaca G, Gulli R, Spano F, Lantieri F, Burlando M, Parodi A, et al. TNF-alpha gene polymorphisms: association with disease susceptibility and response to anti-TNF-alpha treatment in psoriatic arthritis. J Invest Dermatol. 134. United States2014. p. 2503-9.
5. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. JAMA. 305. United States2011. p. 1460-8.
6. Romero-Sánchez C, Londoño J, Delgado G, Jaimes DA, De Avila J, Mora A, et al. Association of tumor necrosis factor alpha-308 promoter polymorphism with spondyloarthritides patients in Colombia. Rheumatology International. 2012;32(7):2195-7.
7. Epstein FH, Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine. 2001;344(12):907-16.
8. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. Lancet. 2011;377(9783):2127-37.
9. D WOOLF A. The bone and joint decade 2000–2010. Annals of the rheumatic diseases. 2000;59(2):81-2.
10. Woolf A. Economic Burden of Rheumatic Diseases. In: Sciences EH, editor. Kelley's Textbook of Rheumatology2012. p. 439-51.
11. Cooper N. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. Rheumatology. 2000;39(1):28-33.
12. Uribe CVC. Artritis reumatoide como enfermedad de alto costo. Revista Colombiana de Reumatología. 2004;11(3):225-31.
13. Mora C, González A, Díaz J, Quintana G. Costos directos de la artritis reumatoide temprana en el primer año de atención: simulación de tres situaciones clínicas en un hospital universitario de tercer nivel de Colombia. Biomédica. 2009;29(1):43-50.
14. Boonen A, Van der Heijde D, Landewe R, Guillemin F, Rutten-van Mölken M, Dougados M, et al. Direct costs of ankylosing spondylitis and its determinants: an analysis among three European countries. Annals of the rheumatic diseases. 2003;62(8):732-40.
15. Ward MM. Functional disability predicts total costs in patients with ankylosing spondylitis. Arthritis & Rheumatism. 2002;46(1):223-31.
16. McInnes I. Cytokines. In: Elsevier, editor.2012.
17. Abbas A. Propiedades y Generalidades de las respuestas inmunitarias. In: Elsevier, editor. Inmunologia celular y molecular. Septima ed2012. p. 1-13.

18. Carswell EA, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1975;72(9):3666-70.
19. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFα gene polymorphisms on TNFα production and disease. Human immunology. 2001;62(11):1191-9.
20. Song G, Bae S-C, Kim J-H, Lee Y. Association between TNF-α promoter –308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatology International. 2014;34(4):465-71.
21. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. Pharmacology & Therapeutics. 2008;117(2):244-79.
22. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. Journal of Clinical Investigation. 1995;95(5):2111.
23. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. Journal of Clinical Investigation. 1993;92(5):2303.
24. van der Poll T, Büller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. New England Journal of Medicine. 1990;322(23):1622-7.
25. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism. 2001;280(5):E745-E51.
26. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. Arthritis & Rheumatism. 1995;38(4):499-505.
27. Lange U, Teichmann J, Stracke H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. European journal of medical research. 2000;5(12):507-11.
28. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. Journal of human genetics. 2002;47(11):0561-6.
29. CARATACHEA MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev inst nal enf resp mex. 2007;20(3):213-21.
30. LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. The Journal of Immunology. 2001;167(10):5838-44.
31. Quinn M, Conaghan P, Emery P. The therapeutic approach of early intervention for rheumatoid arthritis: what is the evidence? Rheumatology. 2001;40(11):1211-20.
32. Braun Jv, Van Den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. Annals of the rheumatic diseases. 2011;70(6):896-904.
33. Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. Journal of Managed Care Pharmacy. 2011;17(9):S14.

34. Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Magnani O, Puppo F. Pharmacogenetics of etanercept: role of TNF-α gene polymorphisms in improving its efficacy. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2014;10(12):1703-10.
35. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. Best Practice & Research Clinical Rheumatology.25(4):549-67.
36. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256(5517):495-7.
37. Gatto B. Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. Reumatismo. 2006;58(2):94-103.
38. Vivar N, Van Vollenhoven RF. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis. F1000prime reports. 2014;6.
39. Bain B, Brazil M. Adalimumab. Nature Reviews Drug Discovery. 2003;2(9):693-4.
40. van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, Sieper J, Dijkmans BAC, Braun J, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis & Rheumatism. 2006;54(7):2136-46.
41. Bartelds GM, Krieckaert CLM, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JWR, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. Jama. 2011;305(14):1460-8.
42. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. Mol Immunol. 1993;30(16):1443-53.
43. Balog A, Klausz G, Gál J, Molnár T, Nagy F, Ocsovszky I, et al. Investigation of the prognostic value of TNF-alpha gene polymorphism among patients treated with infliximab, and the effects of infliximab therapy on TNF-alpha production and apoptosis. Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology. 2003;71(5):274-80.
44. Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, et al. TNFα blockade in human diseases: mechanisms and future directions. Clinical Immunology. 2008;126(2):121-36.
45. van der Heijde D, Da Silva JC, Dougados M, Geher P, van der Horst-Bruinsma I, Juanola X, et al. Etanercept 50 mg once weekly is as effective as 25 mg twice weekly in patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 65. England2006. p. 1572-7.
46. De Groot AS, Scott DW. Immunogenicity of protein therapeutics. Trends in immunology. 2007;28(11):482-90.
47. Wolbink GJ, Aarden LA, Dijkmans BAC. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. Current opinion in rheumatology. 2009;21(3):211-5.
48. Aikawa NE, de Carvalho JF, Silva CAA, Bonfá E. Immunogenicity of anti-TNF-α agents in autoimmune diseases. Clinical reviews in allergy & immunology. 2010;38(2-3):82-9.
49. Scott DW, De Groot AS. Can we prevent immunogenicity of human protein drugs? Annals of the rheumatic diseases. 2010;69(Suppl 1):i72-i6.
50. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nature reviews Drug discovery. 2002;1(6):457-62.
51. Haraoui B, Cameron L, Ouellet M, White B. Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. The Journal of rheumatology. 2006;33(1):31-6.
52. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, MacFarlane JD, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor α monoclonal

antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism. 1998;41(9):1552-63.
53. van Schouwenburg PA, Krieckaert CL, Nurmohamed M, Hart M, Rispens T, Aarden L, et al. IgG4 production against adalimumab during long term treatment of RA patients. Journal of clinical immunology. 2012;32(5):1000-6.
54. Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. New England Journal of Medicine. 2012;366(6):539-51.
55. Mukovozov I, Sabljic T, Hortelano G, Ofosu FA. Factors that contribute to the immmunogenicity of therapeutic recombinant human proteins. THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-. 2008;99(5):874.
56. Bendtzen K. Personalized medicine: theranostics (therapeutics diagnostics) essential for rational use of tumor necrosis factor-alpha antagonists. Discovery medicine. 2013;15(83):201-11.
57. Bakland G, Nossent HC. Epidemiology of spondyloarthritis: a review. Current rheumatology reports. 2013;15(9):1-7.
58. Zeidler H, Amor B. The Assessment in Spondyloarthritis International Society (ASAS) classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general: the spondyloarthritis concept in progress. Annals of the rheumatic diseases. 2011;70(1):1-3.
59. Tam L-S, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(7):399-405.
60. Valle-Onate R, Candia L, Romero-Sánchez C, Iglesias-Gamarra A, Caballero-Uribe CV, Santos-Moreno P, et al. Epidemiology of spondyloarthritis in Colombia. The American journal of the medical sciences. 2011;341(4):293-4.
61. Ward MM. Health-related quality of life in ankylosing spondylitis: A survey of 175 patients. Arthritis Care & Research. 1999;12(4):247-55.
62. Illescas MEB, Menéndez CL, Rodríguez MLR, Quintero RMF. Nuevos criterios ASAS para el diagnóstico de espondiloartritis. Diagnóstico de sacroileítis por resonancia magnética. Radiología. 2014;56(1):7-15.
63. Cawley M, Chalmers T, Kellgren J, Ball J. Destructive lesions of vertebral bodies in ankylosing spondylitis. Annals of the rheumatic diseases. 1972;31(5):345.
64. Smith JA, Märker-Hermann E, Colbert RA. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2006;20(3):571-91.
65. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2009;60(4):966-75.
66. Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. Current opinion in rheumatology. 2001;13(4):265-72.
67. Colbert RA, DeLay ML, Layh-Schmitt G, Sowders DP. HLA‐B27 misfolding and spondyloarthropathies. Prion. 2009;3(1):15-26.
68. Brewerton D, Hart F, Nicholls A, Caffrey M, James D, Sturrock R. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. The Lancet. 1973;301(7809):904-7.
69. Consortium IGoAS. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. Nature genetics. 2013;45(7):730-8.
70. Wei JCC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. Rheumatology. 2004;43(7):839-42.

71. Yamaguchi A, Tsuchiya N, Mitsui H, Shiota M, Ogawa A, Tokunaga K, et al. Association of hla-b39 with hla-b27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in japanese patients. Arthritis & Rheumatism. 1995;38(11):1672-7.
72. International Genetics of Ankylosing Spondylitis C. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. Nature genetics. 2013;45(7):730-8.
73. O'Rielly DD, Rahman P. Advances in the genetics of spondyloarthritis and clinical implications. Current rheumatology reports. 2013;15(8):1-11.
74. Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? Current opinion in rheumatology. 2012;24(4):351-8.
75. McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. Inflammation Research. 2001;50(10):491-5.
76. Zambrano-Zaragoza JF, Agraz-Cibrian JM, González-Reyes C, Durán-Avelar MdJ, Vibanco-Pérez N. Ankylosing spondylitis: from cells to genes. International journal of inflammation. 2013;2013.
77. Vargas-Alarcón G, Casasola-Vargas J, Rodríguez-Pérez JM, Huerta-Sil G, Pérez-Hernández N, Londoño J, et al. Tumor necrosis factor-α promoter polymorphisms in mexican patients with spondyloarthritis. Human immunology. 2006;67(10):826-32.
78. Romero-Sánchez C, Londoño J, Delgado G, Jaimes D, De Avila J, Mora A, et al. Association of tumor necrosis factor alpha-308 promoter polymorphism with spondyloarthritides patients in Colombia. Rheumatology international. 2012;32(7):2195-7.
79. Ji Y, Yang X, Yang L, Wu D, Hua F, Lu T, et al. Studies on correlation between single-nucleotide polymorphisms of tumor necrosis factor gene and different stages of ankylosing spondylitis. Cell biochemistry and biophysics. 2013;67(3):915-22.
80. Tong Q, Zhao L, Qian X-D, Zhang L-L, Xu X, Dai S-M, et al. Association of TNF-α polymorphism with prediction of response to TNF blockers in spondyloarthritis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Pharmacogenomics. 2013;14(14):1691-700.
81. Bacquet-Deschryver H, Jouen F, Quillard M, Menard JF, Goeb V, Lequerré T, et al. Impact of three anti-TNFα biologics on existing and emergent autoimmunity in rheumatoid arthritis and spondylarthropathy patients. Journal of clinical immunology. 2008;28(5):445-55.
82. de Vries MK, van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT, Aarden LA, Stapel SO, Peters MJL, et al. Immunogenicity does not influence treatment with etanercept in patients with ankylosing spondylitis. Annals of the rheumatic diseases. 2009;68(4):531-5.
83. Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Nuno L, Bonilla G, Villalba A, Peiteado D, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of longterm treatment of spondyloarthritis with infliximab. Ann Rheum Dis. 71. England2012. p. 1955-60.
84. Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Garcia-Carazo S, Lojo L, Nuno L, Villalba A, et al. The immunogenicity to the first anti-TNF therapy determines the outcome of switching to a second anti-TNF therapy in spondyloarthritis patients. Arthritis Res Ther. 15. England2013. p. R79.
85. Garces S, Demengeot J, Benito-Garcia E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. Ann Rheum Dis. 72. England2013. p. 1947-55.
86. Chakravarty E, Clowse M. Pregnancy in the Rheumatic Diseases. In: Elsevier, editor. Kelley's textbook of Rheumatology2012. p. 540-58.e3.

87. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism. 1988;31(3):315-24.
88. Gómez A. Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. Reumatología clínica. 2011;6:33-7.
89. Scher J, Abramson S, Pillinger M. Neutrophils. In: Elsevier, editor. Kelley's textbook of Rheumatology2012. p. 152-69.
90. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. The EMBO journal. 1991;10(13):4025.
91. de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. FEBS letters. 2011;585(23):3619-26.
92. Korczowska I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. World journal of orthopedics. 2014;5(4):544.
93. Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon M. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955–1985. Arthritis & Rheumatism. 1999;42(3):415-20.
94. Riise T, Jacobsen BK, Gran J. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway. The Journal of rheumatology. 2000;27(6):1386-9.
95. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. Journal of autoimmunity. 2005;25:16-20.
96. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism. 1999;42(6):1071-9.
97. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature. 2003;423(6937):356-61.
98. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nature Reviews Immunology. 2007;7(6):429-42.
99. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(7):3195-9.
100. Cuenca J, Cuchacovich M, Perez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, et al. The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2003;42(2):308-13.
101. Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Montes de Oca JV, et al. Tumor necrosis factor-alpha− 308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. Journal of autoimmunity. 2005;24(1):63-8.
102. Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. J Rheumatol. 2007;34(1):43-9.
103. Oregon-Romero E, Vazquez-Del Mercado M, Ruiz-Quezada SL, Navarro-Hernandez RE, Rangel-Villalobos H, Martinez-Bonilla G, et al. Tumor necrosis factor alpha-308 and -238 polymorphisms in rheumatoid arthritis. Association with messenger RNA expression and sTNF-alpha. J Investig Med. 2008;56(7):937-43.
104. Bender N, Heilig C, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster F-P, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. Rheumatology International. 2007;27(3):269-74.
105. van der Maas A, van den Bemt BJF, Wolbink G, van den Hoogen FHJ, van Riel PLCM, den Broeder AA. Low infliximab serum trough levels and anti-infliximab antibodies are

prevalent in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab in daily clinical practice: results of an observational cohort study. BMC musculoskeletal disorders. 2012;13(1):184.
106. Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, et al. Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. Allergy. 2010;65(5):657-61.
107. Casallas JCG, Oñate RV. Farmacoeconomía de la terapia biológica de las espondiloartropatías Biological therapy pharmacoeconomics of the spondyloarthropathies. Revista Colombiana de Enfermería.5(5).
108. De Rycke L, Kruithof E, Vandooren B, Tak P, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: Insights from synovial membrane studies. Current Rheumatology Reports. 2006;8(4):275-82.
109. Suryaprasad AG, Prindiville T. The biology of TNF blockade. Autoimmunity Reviews. 2003;2(6):346-57.
110. van der Linden MW, Huizinga TWJ, Stoeken D-J, Sturk A, Westendorp RGJ. Determination of tumour necrosis factor-α and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. Journal of immunological methods. 1998;218(1):63-71.
111. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. Biochim Biophys Acta. 2009;1792(3):163-72.
112. Rudwaleit M, Höhler T. Cytokine gene polymorphisms relevant for the spondyloarthropathies. Current opinion in rheumatology. 2001;13(4):250-4.
113. Sousa E, Caetano-Lopes J, Pinto P, Pimentel F, Teles J, Canhão H, et al. Ankylosing spondylitis susceptibility and severity—contribution of TNF gene promoter polymorphisms at positions–238 and–308. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1173(1):581-8.
114. Verjans G, Brinkman BMN, Doornik CEM, Kijlstra A, Verweij CL. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) at position–308 in relation to ankylosing spondylitis. Clinical & Experimental Immunology. 1994;97(1):45-7.
115. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Burmester G, et al. Two year maintenance of efficacy and safety of infliximab in the treatment of ankylosing spondylitis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2005;64(2):229-34.
116. Keat A, Barkham N, Bhalla A, Gaffney K, Marzo-Ortega H, Paul S, et al. BSR guidelines for prescribing TNF-α blockers in adults with ankylosing spondylitis. Report of a working party of the British Society for Rheumatology. Rheumatology. 2005;44(7):939-47.
117. Benhamou M, Gossec L, Dougados M. Clinical relevance of C-reactive protein in ankylosing spondylitis and evaluation of the NSAIDs/coxibs' treatment effect on C-reactive protein. Rheumatology. 2010;49(3):536-41.
118. Gorman JD, Sack KE, Davis Jr JC. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor α. New England Journal of Medicine. 2002;346(18):1349-56.
119. de Vries MK, van Eijk IC, van der Horst-bruinsma IE, Peters MJL, Nurmohamed MT, Dijkmans BAC, et al. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein level, and serum amyloid A protein for patient selection and monitoring of anti–tumor necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis. Arthritis Care & Research. 2009;61(11):1484-90.
120. Yang Z, Zhao W, Liu W, Lv Q, Dong X. Efficacy evaluation of methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis using meta-analysis. Int J Clin Pharmacol Ther. 52. Germany2014. p. 346-51.

121. Aranda F, Perés Wingeyer SD, Schneeberger E, Valerio M, Saint Martin E, Dal Pra F, et al. The− 308 G/A polymorphism in the tumor necrosis factor-α gene is not associated with development and progression of rheumatoid arthritis in Argentinean patients. International journal of rheumatic diseases. 2014.
122. Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Wang S, Li G, Gao J, et al. Association between tumor necrosis factor-α (TNF-α) promoter-308 G/A and response to TNF-α blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Modern rheumatology. 2013;23(3):489-95.
123. Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, de Oca JVM, et al. Tumor necrosis factor-alpha− 308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. Journal of autoimmunity. 2005;24(1):63-8.
124. Lipsky PE, van der Heijde DMFM, St. Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine. 2000;343(22):1594-602.
125. Ducourau E, Mulleman D, Paintaud G, Miow Lin DC, Lauferon F, Ternant D, et al. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 13. England2011. p. R105.
126. Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, Nuno L, Bonilla G, Nagore D, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 50. England2011. p. 1445-52.
127. Furst DE, Schiff MH, Fleischmann RM, Strand V, Birbara CA, Compagnone D, et al. Adalimumab, a fully human anti tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). The Journal of Rheumatology. 2003;30(12):2563-71.
128. Emi Aikawa N, de Carvalho J, Artur Almeida Silva C, Bonfá E. Immunogenicity of Anti-TNF-α Agents in Autoimmune Diseases. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2010;38(2-3):82-9.
129. Kneepkens EL, Wei JC-C, Nurmohamed MT, Yeo K-J, Chen CY, van der Horst-Bruinsma IE, et al. Immunogenicity, adalimumab levels and clinical response in ankylosing spondylitis patients during 24 weeks of follow-up. Annals of the rheumatic diseases. 2013:annrheumdis-2013.
130. Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U, Dreyer L, Hansen A, Hansen IT, et al. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. Arthritis & Rheumatism. 2010;62(1):22-32.

ANEXOS

Anexo 1.Loci asociados con EAS, descubiertos mediante el uso de estudios asociados a GWAS

Gen/Locus	**Localización en el Cromosoma**	**Enfermedad Asociada**		
		PsV	**PsA**	**AS**
IFNLR1/IL-28RA	1p36.11	X		
IL-23R	1p31.3	X	X	X
LCE3B/3C	1q21.3	X		
KIF21B	1q32.1			X
RUNX3	1p36	X		X
TNFRSF9	1p36	X		
B3GNT2	2p15	X		
REL	2p13-p12	X	X	
IL-1R2	2q12			X
IFIH1	2q24	X		
ANTXR2	4q21.21			X
PTGER4	5p13.1			X
HAPLN1	5q14			X
EDIL3	5q14			X
ERAP1	5q15	X		X
IL-13/IL-4	5q31	X		
IL-12B	5q31.1-q33.1	X	X	X
TNIP1	5q32-q.33.1	X	X	
TAGAP	6p25.3	X		
IRF4	6p25-p23	X		
HLA-B/C	6p21.3	X	X	X
TRAF3IP	6p21	X	X	
TNFAIP3	6q23	X		
ELMO1	7p14.1	X		
DEFB4	8p23.1	X		
DDX58	9p12	X		
KLF4	9q31	X		
CARD9	9q34.3			X
ZMIZ1	10q22.3	X		
PRDX5	11q13	X		
ZC3H12C	11q22.3	X		
ETS1	11q23.3	X		
LTBR/TNFRSF1A	12p13			X
ANO6	12q12			X

IL-23A	12q13.3	X		
NFKBIA	14q13	X		
SOCS1	16p13.13	X		
FBXL19	16p11.2	X	X	
NOS2	17q11.2-q12	X		
STAT3 STAT5A/B	17q21.31	X		
TBKBP1	17q21.32			X
CARD14	17q25	X		
MBD2	18q21	X		
CARM1	19p13.2	X		
ILF3	19p13.2	X		
TYK2	19p13.2	X	X	
RNF114	20q13.13	X		
UBE2L3	22q11.21	X		

Abreviaturas: PsV en inglés: *Psoriasis*; PsA en inglés, *Psoriatic arthritis*; AS en inglés *Ankylosing spondylitis*.

Anexo 2. Consentimiento informado

AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LA MUESTRA DE SANGRE EN UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS.

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Romero Sánchez María Consuelo(Msc PhD –Servicio de reumatología -Hospital Militar) spacolombia@gmail.com
Teléfono 3127771226-34868686 Ext 5050

CO-INVESTIGADORES RESPONSABLE POR INSTITUCION PARTICIPANTE:
Bello Gualteros Juan Manuel (MD reumatólogo Servicio de Reumatología-Hospital Militar Central)
Guzmán Vergara Claudia M (MD reumatólogo. Servicio de Reumatología Hospital Militar Central)
MesaAna María (Enfermera Jefe. Servicio de Reumatología Hospital Militar Central)
Giovanny Ballesteros MD. (Residente de reumatología Universidad Militar Nueva Granada. Servicio de Reumatología Hospital Militar Central)
Diana Muñoz Forero. Bcl (Servicio de Reumatología Hospital Militar Central)
John Londoño. MD (Servicio de Reumatología Hospital Militar Central)
La presente investigación está avalada por el comité de Ética del Hospital Militar Central institución en la ciudad de Bogotá donde se realizará el estudio.en él participará el Servicio de Reumatologia que atienden pacientes con artritis reumatoide y espondiloartritis.

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:
"Presencia del polimorfismo -308 del TNF-α y su relación con inmunogenicidad.niveles séricos de fármacos anti-TNF-α y respuesta clínica en pacientes con Artritis Reumatoide y Espondiloartritis en el Hospital Militar Central".

El presente es un formato de aceptación para que mi muestra sea usada en un estudio sobre la respuesta inmune de mi organismo a los fármacos anti factor de necrosis tumoral prescritos por mi enfermedad. La terapia anti factor de necrosis tumoral (anti TNF) es una importante alternativa de manejo de la enfermedades crónicas inflamatorias incluyendo la Artritis reumatoide (AR) y las Espondiloartritis (EAS). Sin embargo algunos pacientes no responden al tratamiento.y no se sabe con certeza la causa. Por lo tanto la muestra tomada de sangre será estudiada para ver el contenido de sustancias que pueden ayudar a predecir la evolución y respuesta a los medicamentos en la enfermedad.para brindar mejores tratamientos a futuro.

Conozco que para el manejo actual correcto de la enfermedad que tengo.es importante que tomen una muestra de sangre.por lo tanto autorizó para que una parte de la muestra sea usada en el estudio y en otros estudios que se deriven directamente de esta investigación.

El protocolo de investigación consistirá en la consulta normal con su médico tratante y la toma de muestras de sangre para confirmar el estado de defensas de su organismo.

Toma de sangre. Se utilizarán las muestras tomadas previamente y en caso de no ser óptimasse realizará una nueva toma de muestra de 5 ml de sangre cada una por una persona experta de manera similar a una muestra de sangre que se toma de rutina antes de comenzar la infusión de su medicamento.
COMPENSACIÓN: Usted no recibirá dinero por participar en el estudio.pero su ayuda en podría beneficiar a los pacientes en el futuro.al obtenerse resultados científicos que permitan desarrollar mejores tratamientos médicos. Los costos del examen de sangre para evaluar sus defensas serán cubiertos por el estudio. Otros procedimientos para tratar la enfermedad que se realizaran posteriormente no serán cubiertos.
RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos de este procedimiento serán mínimos. Personal con experiencia realizará los procedimientos utilizando medidas de seguridad estandarizadas. Estos incluyen el uso de ropa protectora (blusas de laboratorio) y guantes. Además todos los materiales necesarios que se utilicen serán desechables y la toma de sangre no representará ningún riesgo para usted.ya que el volumen tomado corresponde a una mínima parte de la sangre comparado con la que se extrae cuando usted hace una donación de sangre. Después de la toma de sangre usted puede sentir un poco de dolor en el sitio y podría aparecer un morado en la piel que desaparecerá en unos días.

BENEFICIOS: Al contribuir con este estudio.usted está permitiendo la obtención de información científica que permitirá desarrollar tratamientos futuros.y como participante del mismo tendrá acceso a la información que se obtenga de sus estudios siempre y cuando la requiera.además de satisfacción personal al ser pionero y apoyar con su participación en la investigación.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial.con la excepción de que la ley requiera la información. Si existe alguna publicación como resultado de este estudio.usted no será identificado por su nombre.

COMPLICACIONES: Usted debe recordar que la posibilidad de complicaciones por su participación en este estudio es muy baja. Si usted tiene alguna complicación usted puede llamar a los números de teléfono celulares de los investigadores encargados en la institución que aparecen al inicio de este documento.ellos lo orientarán y le proporcionarán la información necesaria para su solución.

RETIRO DEL ESTUDIO: Usted está de acuerdo en que su participación en este estudio es completamente voluntaria y que puede retirarse del mismo en cualquier momento avisando con tiempo a los investigadores. Esta decisión no lo afectará en el presente o futuro. Es posible que alguno de los investigadores pueda retirarlo del estudio si es necesario al encontrar alguna situación que lo requiera para su beneficio.

DERECHOS DE LA PERSONA: A usted se le ha dado la oportunidad de preguntar acerca de este estudio y de su participación en él. Tiene derecho a que sus preguntas se respondan a su completa satisfacción. Usted debe hacer sus preguntas ahora antes de firmar este documento o en cualquier momento después de firmarlo. Si usted desea alguna otra información o tiene preguntas acerca de los derechos de una persona que participa en investigación.puede contactar a los

investigadores encargados en cualquier momento a los números de teléfono que se encuentran en la primera página de este documento.
DURACION DE LA INVESTIGACION:

Tendrá un periodo aproximado de 18 meses académicos.

ACUERDO: Yo he leído y entendido este informe de consentimiento. Estoy de acuerdo en que voy a participar en este estudio de investigación. Cuando firme este documento recibiré si así lo deseo una copia de este informe de consentimiento.

_____ _____ ___/ ___/___
Nombre del Participante y cédula Firma Fecha

_____
Dirección y teléfono

_____ _____ ___/___/ ___
Nombre del Testigo 1 y cédula Firma Fecha

_____ Relación con el paciente_____
Dirección y teléfono

_____ _____ ___/___/___
Nombre del Testigo 2 y cédula Firma Fecha

_____ Relación con el paciente_____
Dirección y teléfono

_____ _____ _____
Nombre del Investigador y cédula Firma Fecha

_____
Dirección y teléfono

HOSPITAL MILITAR CENTRAL

Consentimiento Informado: Requerido, Presentado, se entrega firmado y fechado en sus 4 folios

CONCEPTO: Estudio observacional, analítico corte transversal, que adopta los principios de investigación biomédica para investigación en seres humanos a nivel nacional:

- Resolución No. 8430/93 del Ministerio de Salud.

El Comité Independiente de Ética en Investigación del Hospital Militar Central opera de acuerdo con:
Regulación Internacional
- Normas de Buenas Prácticas Clínicas (ICH_ GCP)
- Declaración de Helsinki (Seúl, Corea 2008)

Regulación Nacional
- Resolución 8430 de 1993 (04 de Octubre)
- Resolución 2378 de 2008 (Junio 27)

Regulaciones Institucionales
- Resolución 1019 del 21 oct 2010

Regulaciones del Comité.

Comité Independiente de Ética en Investigación
Hospital Militar Central
Transversal 3 No. 49 -00 Piso 13
Telefax: 571 3486868 Ext. 5363-5136

DR. JAVIER IGNACIO GODOY BARBOSA
Presidente

Proyecto y Elaboró: ihc

Anexo 3. Variables de Estudio

Nombre	Tipo de Variable Según Naturaleza	Definición Operativa	Escala de Medición
Edad	Continua	Años cumplidos por el paciente	Razón
Sexo	Discreta Dicotómica	Mujer	Nominal Dicotómica
		Hombre	
Comorbilidades	Discreta	Diabetes Mellitus	Nominal
		Tabaquismo	
		Hipertensión	
		Dislipidemia	
		Hipotiroidismo	
		Otros	
DMARD previo	Discreta	Prednisolona	Nominal
		Metotrexato	
		Leflunomida	
		Sulfasalazina	
		Antimalarico	
		Ciclosporina	
Biológico Previo	Discreta	Infliximab	Nominal
		Adalimumab	
		Etanercept	
		Golimumab	
		Certolizumab	
		Rituximab	
		Abatacept	
		Tocilizumab	
DMARD actual	Discreta	Prednisolona	Nominal
		Metrotexate	
		Leflunomida Sulfasalazina	
		Antimalarico	
		Ciclosporina	
Biológico actual	Discreta	Infliximab	Nominal
		Adalimumab	
		Etanercept	
		Golimumab	
		Certolizumab	
		Rituximab	
		Abatacept	
		Tocilizumab	

Escala Análoga del Dolor (VAS)	Continua	Valor referido por el paciente que califica el dolor sentido en la última semana en una escala de 0 a 100nm para los pacientes con AR.	Razón
Proteína C Reactiva (PCR)	Continua	Valor de PCR tomada una hora antes de la infusión del medicamento biológico. <3mg/L Normal >3mg/L Aumentado	Razón
Velocidad de Sedimentación Globular (VSG)	Continua	Valor de VSG tomada una hora antes de la infusión del medicamento biológico. <20mm/H Normal >20mm/H Aumentado	Razón
Niveles séricos del Medicamento	Continua	Resultado numérico del ELISA realizado una hora antes de la infusión del medicamento.	Razón
Títulos de ADAs contra el medicamento	Continua	Resultado numérico del ELISA realizado una hora antes de la infusión del medicamento.	Razón
Polimorfismos -308 A/G	Discreta	Positivo Negativo	Nominal
Polimorfismos -308 G/G	Discreta	Positivo Negativo	Nominal
Polimorfismos -308 A/A	Discreta	Positivo Negativo	Nominal
ARTRITIS REUMATOIDE			
AR	Discreta	Diagnóstico de la enfermedad según criterios ACR 1987 para AR establecida y ACR-EULAR 2010 para AR temprana Si No	Nominal Dicotómica
Edad al Diagnostico de AR	Continua	Años cumplidos por el paciente en el momento que se diagnosticó la AR.	Intervalo

Numero de Articulaciones Inflamadas (NAI)	Continua	Número de Articulaciones Inflamadas al examen físico sobre un conteo total de 28 para los pacientes con AR.	Razón
Número de Articulaciones Dolorosas (NAD)	Continua	Número de Articulaciones dolorosas al examen físico sobre un conteo total de 28 para los pacientes con AR.	Razón
DAS28	Continua	Resultado del índice de actividad para AR denominado DAS28, en una escala continua 0-9.4	Razón
CDAI	Continua	Suma aritmética del NAD+NAI+VAS, en una escala continua de 0-76	Razón
Actividad de AR	Discreta	Según el valor de DAS28 se dividirán los pacientes según su nivel de actividad en: Remisión <2.6 Baja actividad 2.6-3.2 Moderada Actividad 3.2-5.1 Alta actividad >5.1	Ordinal
HAQ DI	Continua	Resultado de aplicar la encuesta denominado HAQ DI en la que se genera un valor numérico que determina el nivel de funcionalidad del paciente 0-3	Razón
ESPONDILOARTRITIS			
EAS	Discreta	Diagnóstico de la enfermedad según criterios ASAS 2010 para todas las EAS, excepto para Artritis Psoriásica para los que se utilizaron los criterios CASPAR Si No	Nominal Dicotómica
Edad al Diagnóstico de EAS	Continua	Años Cumplidos por el paciente en el momento que se diagnosticó EAS	Intervalo

BASDAI	Continua	Resultado de aplicar la encuesta denominada BASDAI a los pacientes con EAS, se obtiene un valor continuo de 0-10	Razón
Actividad de EAS	Discreta	Inactivo con resultado de BASDAI 0-4 Activo con resultado de BASDAI > 4	Ordinal
BASFI	Continua	Resultado de aplicar la escala denominada BASDAI a los pacientes con EAS. Se obtiene un valor continuo de 0-10	Razón
Funcionalidad EAS	Discreta	Según el resultado de BASFI se clasifica así: Funcional 0-4 No funcional >4	Ordinal

Anexo 4 Aprobación del Proyecto.

HOSPITAL MILITAR CENTRAL

Bogotá D.C, 17 DIC 2013

No 8084 DIGE/CIEI

Asunto: APROBACIÓN

A los : Doctores
Maria Consuelo Romero Sánchez
Juan Manuel Bello Ballesteros
Claudia Guzmán Vergara
Ana María Mesa
Diana Muñoz Forero
Wilson Bautista
Giovanny Ballesteros
John Darío Londoño Patiño
Investigadores
Hospital Militar Central

PROTOCOLO 2013-122

"Presencia de polimorfismo 308 del FNT y su relación con inmunogenicidad, niveles sericos de fármacos anti FNT y respuesta clínica en pacientes con artritis reumatoide y espóndilo artropatías en el Hospital Militar Central"

Respetados Doctores:

El Comité Independiente de Ética en Investigación del Hospital Militar Central en reunión del día 06 de Diciembre de 2013 según consta en el Acta No.20.
El quórum se obtiene con la participación mayor al 50%
Asisten 5 de los 9 miembros con voz y voto, Quórum: 55.55%

No.	NOMBRE	CARGO	PROFESIÓN
1	Dr. Javier Ignacio Godoy Barbosa	Presidente	Hemato oncólogo
2	Dr. Mauricio Alexis Parra	Miembro	Cirujano General
3	My (r) Maria Eugenia Mican	Miembro	Administradora
4	Enf. Flor Angela Calderón	Miembro	Enfermera - Bioeticista
5	Co (r) Luz Elsy Zamora	Miembro Comunidad	Contadora
6	Enf. Ingrid Janneth Hortta Campos	Secretaria	Con voz pero sin voto

Revisó y **APROBÓ:**

El estudio de la referencia teniendo en cuenta:
Categoría: Investigación con riesgo mínimo.

"Salud – Calidad – Humanización"

Anexo 5. Autorización Ejecución del Proyecto

MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL
HOSPITAL MILITAR CENTRAL
DIRECCIÓN GENERAL
SUDIRECCION DE DOCENCIA E INVESTIGACION CIENTIFICA

Bogotá D.C., 20 DIC 2013
No 3 8594 /DIGE-SDIC-UNIC.

Asunto: Autorización Ejecución proyecto de investigación código 2013-122

Al: Doctores
María Consuelo Romero Sánchez, Juan Manuel Bello Gualteros, Claudia Guzman, John Londoño, María Mesa, Diana Muñoz Forero, Wilson Bautista, Giovanny Ballesteros.
Servicio **Reumatologia-Inmunologia**
Gn.-

El Comité de Investigación Científica del HOMIC que sesionó el día 18 de Diciembre del año en curso, previa revisión de las aprobaciones metodológica y ética del protocolo de investigación titulado ***"PRESENCIA DE POLIMORFISMO 308 DEL FNT Y SU RELACIÓN CON INMUNOGENICIDAD, NIVELES SÉRICOS DE FÁRMACOS ANTI FNT Y RESPUESTA CLÍNICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y ESPONDILO ARTROPATÍAS EN EL HOSPITAL MILITAR CENTRAL",*** registrado en la Unidad de Investigación Científica con el código 2013-122, autoriza la ejecución del proyecto en esta institución.

Los investigadores deben presentar copia de esta autorización en las unidades o áreas donde requieran obtener información o acceso para el desarrollo del proyecto.

En caso de ser suspendido el estudio o de la realización de cualquier modificación del protocolo deben reportar por escrito a la Unidad de Investigación Científica la información correspondiente con los respectivos soportes.

Una vez finalizado el estudio el investigador principal debe presentar a la Unidad de Investigación Científica en medio magnético (CD) el informe final de la ejecución del proyecto y todos los documentos que soporten la difusión del mismo (ej. artículos, memorias de congresos, etc.).

Con todo respeto,

Coronel Médico **Ranniery Acuña Cordero**
Subdirector de Docencia e Investigación Científica

Luz Mabel Ávila Portillo Blc,Msc, Pchd
Jefe Unidad de Investigación Científica

Elaboró Dra. Claudia L. Echeverría
Coordinadora Investigación Académica

Anexo: Aprobación del Comité de Ética