



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio de HLA de clase I y KIR
en Artritis Reumatoide

D. Pablo Mesa del Castillo Bermejo
2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de integración y modulación de señales en biomedicina

**Estudio de HLA de clase I y KIR en Artritis
Reumatoide**

D. Pablo Mesa del Castillo Bermejo

Murcia, 2022



D. LUIS FRANCISCO LINARES FERRANDO, Doctor de Universidad del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE HLA DE CLASE I Y KIR EN ARTRITIS REUMATOIDE", realizada por D. PABLO MESA DEL CASTILLO BERMEJO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de JULIO de 2022

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'L' followed by a horizontal line.

Va por todos vosotros...

Va por mis mujercitas...

Va por mi madre y hermanos...

Va por toda mi familia...

Va por mis amigos...

Va por mis compañeros...

Va por ti, padre.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos para todos aquellos que de alguna forma han participado en este trabajo y han hecho posible su consecución.

Agradecer a mis directores, Luis Francisco Linares y Lourdes Gimeno su disposición a ayudarme y acompañarme en este proceso, que ha sido largo.

A Pedro Castellón (D.E.P.) y Rocío Álvarez por diseñar el trabajo hace muchos años y animarme a su desarrollo.

Al servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca al completo por su inestimable ayuda en el procesamiento de muestras y en particular a Idoia, que me ayudó a trabajarlas especialmente. A los doctores Rocío Álvarez, Ana María García Alonso, Manuel Muro y Alfredo Minguela por facilitar la consecución del trabajo con medios materiales y humanos, a Lourdes de nuevo por su trabajo incansable en esta tarea.

Al servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca por permitirme acometer la tarea, especialmente a Alberto Bermúdez, Carlos Marras, Luis Linares y Paco Angosto por apoyarme en todo momento. A Carmen Iniesta y Begoña Cascales por su siempre buena disposición para extraer las muestras de los pacientes.

A los pacientes que han participado en este estudio, han sido ejemplares en su colaboración, siempre dando una lección de vida ante una enfermedad tan molesta como la artritis reumatoide.

A José Miguel Bolarín por ayudarme con el montaje de la base de datos y la estadística de esta tesis, sin él y su infinita paciencia tampoco habría sido posible este trabajo.

A mi querida Encarna, mis hijas Ana, María y Gracia, porque dan sentido a mis esfuerzos cotidianos, incluidas todas las horas de este trabajo; son mis pilares y sin su cariño y apoyo no podría haberlo hecho. A mi madre María Jesús porque sabe motivarme como nadie y tener siempre un buen consejo a mano. A mis hermanos María y Jesús por estar ahí, desde siempre y para siempre.

A mis amigos, doctores y no doctores, a todos aquellos que me animan siempre y desinteresadamente quieren lo mejor para mí.

Por último, este trabajo no habría sido posible sin un germen de mi infancia, un trabajo inacabado de alguien que se marchó pronto, mi padre Jesús. Se lo agradezco porque sin el tesón que vi en él no creo que hubiese terminado esta tesis.

“Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles, sino más misteriosas”

Albert Schweitzer

ABREVIATURAS

ACPA	Anticuerpos anti péptidos citrulinados.
ACR	Colegio Americano de Reumatología (del inglés <i>American College of Rheumatology</i>).
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
AIMS	Escalas de medición del impacto de la artritis (del inglés <i>Arthritis Impact Measurement Scales</i>).
ANA	Anticuerpos anti-nucleares
ANOEs	Anticuerpos no órgano específicos.
AR	Artritis Reumatoide
ARA	<i>American Rheumatology Association</i> .
ATM	Articulación témporo-mandibular.
CDAI	Índice clínico de la actividad de la enfermedad (del inglés <i>Clinical Disease Activity Index</i>)
CLINHAQ	HAQ clínico.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad.
DAS	Puntuación de actividad de la enfermedad (del inglés: <i>Disease activity score</i>).
DNA	Ácido desoxiribonucleico (del inglés <i>desoxiribonucleic acid</i>).
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético.
ENAs	Anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo.
EULAR	Sociedad Europea de Reumatología (del inglés <i>European League Against Rheumatism</i>).
FR	Factor Reumatoide.
IFD	Interfalángica distal.

IFP	Interfalángica proximal.
JAK	Janus Kinasa.
FAME	Fármaco antireumático modificador de la enfermedad.
FAMEb	Fármaco antireumático modificador de la enfermedad biológico.
FAMEsc	Fármaco antireumático modificador de la enfermedad sintético clásico.
FAMEsd	Fármaco antireumático modificador de la enfermedad sintético dirigido.
HAQ	Cuestionario de valoración de salud (del inglés <i>Health assessment questionnaire</i>).
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (del inglés <i>Human Leucocyte Antigen</i>).
KIR	Receptor tipo inmunoglobulina de célula NK (del inglés <i>Killer immunoglobulin like receptor</i>).
MCF	Metacarpo falángica
MDHAQ	HAQ multidimensional
MHAQ	HAQ modificado
MTF	Metatarsfalángica
NK	Asesina natural (del inglés <i>Natural Killer</i>).
OR	Razón de probabilidades (del inglés <i>Odds Ratio</i>).
PCR	Proteína C Reactiva.
RAPID3	Índice de datos rutinarios a valorar 3 (del inglés <i>Routine Assessment of Patient Index Data 3</i>).
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>).
RNP70	Ribonucleoproteína nuclear 70 KDa

RS3PE	Polisinovitis aguda edematosa del anciano (del inglés <i>Remitting Seronegative Symmetrical Synovitis with Pitting Edema</i>).
SDAI	Índice simplificado de actividad de la enfermedad (del inglés <i>simplified disease activity index</i>).
SF36	Cuestionario corto 36 (del inglés <i>short form 36</i>)
SSA-Ro	Péptido A relacionado con Síndrome de Sjögren (del inglés <i>Anti-Sjögren's syndrome related antigen A</i>)
SSB-La	Péptido B relacionado con Síndrome de Sjögren (del inglés <i>Anti-Sjögren's syndrome related antigen B</i>)
TAP	Proteína transportadora asociada al procesamiento antigénico (del inglés <i>transporter associated with antigen processing</i>)
TCR	Receptor de célula T (del inglés <i>T cell Receptor</i>).
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa.
U1RNP	Ribonucleoproteína nuclear U1
VAS	Escala analógica visual (del inglés <i>visual analog scale</i>)
VSG	Velocidad de sedimentación globular.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. HISTORIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.	3
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	5
3.1 DEFINICIÓN DE CASO.	6
3.2 PREVALENCIA, INCIDENCIA E IMPACTO.	8
4. ETIOPATOGENIA.....	10
4.1 GENÉTICA.....	10
4.2 EPIGENÉTICA.....	11
4.3 FACTORES AMBIENTALES.....	12
4.4 INMUNIDAD Y ARTRITIS REUMATOIDE.....	12
5. CLÍNICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	31
5.1 MANIFESTACIONES ARTICULARES.	34
5.2 MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES.	41
6. MEDIDAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	46
7. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	50
7.1 FÁRMACOS ANTIREUMÁTICOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD SINTÉTICOS.....	51
7.2 FAME BIOLÓGICOS.....	52
7.3 RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	53
7.4 ARTRITIS REUMATOIDE REFRACTARIA.....	54
8.-JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
1. HIPÓTESIS.....	58
2. OBJETIVOS.....	58
2.1 Objetivos primarios:	58

2.2 Objetivos secundarios:	59
PACIENTES Y MÉTODOS	60
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	61
2. DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE.	61
3. PACIENTES Y CONTROLES.	61
3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.....	62
3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CONTROLES SANOS.....	62
4. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	63
4.1 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS; OBTENCIÓN Y ALMACENAJE ADN.	63
4.2 PROCEDIMIENTO PCR-SSO.....	64
4.3 GENOTIPAJE HLA A, B Y C.....	65
4.4 GENOTIPAJE DE GENES KIR.....	69
5. VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EXPERIMENTALES.....	72
5.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS.	72
5.2 VARIABLES CLÍNICAS.....	73
5.3 VARIABLES EXPERIMENTALES.	75
6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	77
RESULTADOS.....	78
OBJETIVO 1. Descripción de la cohorte de pacientes con artritis reumatoide y población control.	79
1.1 COHORTE DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.....	79
1.2 COHORTE DE SUJETOS GRUPO CONTROL.....	86
OBJETIVO 2. Analizar las diferencias de frecuencias alélicas del HLA clásico de clase I (A, B y C) entre pacientes con Artritis Reumatoide y controles.	86
2.1 HLA-A.	87
2.2 HLA-B.	88
2.3 HLA-C.	90

OBJETIVO 3. Analizar las diferencias de frecuencias alélicas de ligandos KIR entre pacientes con AR y controles: en HLA-C en función de su dimorfismo en las posiciones 77 y 80 de la cadena alfa1 (C1, C2 respectivamente); en HLA-A y HLA-B en función del dimorfismo en posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (Bw4, Bw6).	91
OBJETIVO 4. Analizar las frecuencias alélicas de genes y haplotipos KIR entre casos y controles.	92
4.1 GENES KIR.	92
4.2 GENOTIPOS KIR.....	94
4.2 HAPLOTIPOS KIR.	95
OBJETIVO 5. Estudiar las combinaciones HLA/KIR en los pacientes con AR en relación con las de la población control.....	96
5.1 Ligandos KIR en base a dimorfismo en posición 80 de cadena alfa 1 de HLA-C frente a genes KIR y haplotipos KIR.	96
5.2. Ligandos KIR en base a dimorfismo en posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (Bw4, Bw6) frente a genes KIR y haplotipos KIR.....	97
5.3 KIR2DS3, KIR3DS1 y KIR3DL5 frente a alelos HLA de clase I.	99
5.4 Alelos de HLA de clase I con frecuencias significativamente diferentes entre pacientes y controles frente a genes y haplotipos y KIR.	99
5.5 Correlaciones o ligamientos entre genes KIR. Diferencias entre pacientes y controles en cuanto a ligandos KIR.	100
OBJETIVO 6: Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) en pacientes con AR respecto a variables cualitativas clínicas.	101
6.1 HLA-A.	101
6.2 HLA-B.	104
6.3 HLA-C.	106
6.4 LIGANDOS DE KIR Y HAPLOTIPOS KIR.	108
6.5 KIR.....	109
OBJETIVO 7. Análisis de asociación entre variables cualitativas de laboratorio en pacientes y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos, ligandos KIR, haplotipos KIR y genes KIR.	110

7.1 HLA-A.....	110
7.2 HLA-B.....	112
7.3 HLA-C.....	113
7.4 LIGANDOS Y HAPLOTIPOS KIR.....	114
7.5 KIR.....	114
OBJETIVO 8. Análisis de asociación entre variables cualitativas de tratamiento en pacientes y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), ligandos KIR, genes y haplotipos KIR.	115
8.1 HLA-A.....	115
8.2 HLA-B.....	116
8.3 HLA-C.....	118
8.4 LIGANDOS Y HAPLOTIPOS KIR.....	119
8.5 GENES KIR.....	119
OBJETIVO 9. Análisis de asociación entre variables cuantitativas seleccionadas y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos, ligandos KIR, haplotipos KIR, genes KIR y otras asociaciones que hubieran resultado significativas en el estudio caso-control.	120
DISCUSIÓN.....	122
CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	143
ANEXOS.....	161
ANEXO I. APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA.	162

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a múltiples articulaciones de forma simétrica y destructiva produciendo deformidades típicas. Los pacientes con AR presentan una importante morbilidad y discapacidad progresivas con menor esperanza de vida que la población sana (1).

La AR afecta al 0.5-1% de la población en países industrializados de todo el mundo, lo que la convierte en una de las enfermedades inflamatorias crónicas más frecuentes y un problema de salud de primer orden en países desarrollados, incluida España (2). Debemos destacar en primera instancia que los nuevos tratamientos y mejoras en su diagnóstico han modificado sustancialmente la historia natural de la AR, aunque a día de hoy aún no disponemos de una cura para ella.

La causa de la AR no es del todo conocida y se postulan varias teorías que desde una perspectiva multifactorial intentan explicar la fisiopatología de la enfermedad. La marca de la enfermedad es la inflamación tanto articular como sistémica y la autoinmunidad en forma de autoanticuerpos; aun así, se trata de una enfermedad heterogénea tanto desde un punto de vista clínico como patológico cuya causa se mantiene esquiva hoy en día (3).

Como en todas las enfermedades autoinmunes, en la AR se produce una alteración en el reconocimiento de lo propio y lo ajeno que origina una inflamación sin noxa claramente identificable. En el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) reside gran parte de la capacidad que tiene el organismo para identificar qué células pertenecen al propio organismo y para reaccionar ante ellas. En humanos el CMH se denomina HLA (*Human Leukocyte Antigen* o antígeno leucocitario humano).

Existe una clara agregación familiar en la AR y se ha estudiado en detalle la carga genética de estos pacientes; se trata de una susceptibilidad genética poligénica, en la que la mayor parte del riesgo para padecer una AR se asocia a la región del HLA. Dentro de esta región del cromosoma 6, el riesgo es más

claro para alelos del HLA de clase II, encargados de la inmunidad adquirida, pero también se han identificado alelos en el HLA de clase I (4).

Particularmente el locus C ha puesto de manifiesto su importancia en enfermedades autoinmunes incluida la AR, como actor principal de mediación en la inmunidad innata mediada por células *natural killer* (NK), asociado a un patrón de expresión de los denominados *Killer Immunoglobulin like Receptors* (KIRs), capaces de activar o inhibir a la célula NK (5,6).

Este y otros hallazgos han llevado a reconsiderar a la AR, no como una enfermedad exclusivamente autoinmune (relacionada con la inmunidad adquirida), sino como una enfermedad en la que la inmunidad innata también tienen un papel en su patogenia.

De hecho, la separación de la inmunidad en innata y adaptativa es un concepto más académico que real desde un punto de vista biológico por lo que este abordaje tiene mucho sentido.

2. HISTORIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.

La AR genera grandes retos desde el punto de vista etiopatogénico, pero también desde un punto de vista histórico. Hasta el año 1800 no disponemos de una descripción clara de la AR con la publicación de un caso llamado “*gota asténica primitiva*” por parte de Auguste Landré-Beauvais con un estudio post-mortem del todo compatible, donde describe el pannus reumatoide articular destructivo (7). Posteriormente Charcot utilizó el término “*reumatismo articular progresivo*” (8) y el primero que utiliza el término “*artritis reumatoide*” es Alfred B. Garrod en 1859 (9). Aun así, la AR continúa teniendo diversos nombres hasta que finalmente en 1941 se acepta el término Artritis Reumatoide en la Asociación Americana de Reumatología (*American Rheumatism Association*).

Algunos autores, basándose en las imprecisas descripciones y la ausencia de iconografía defienden que la artritis reumatoide no existía en Europa hasta el siglo XIX, lo que abrió perspectivas interesantes acerca de un

agente causal aparecido en aquel momento histórico, responsable de la enfermedad y probablemente procedente del nuevo mundo (10). Otros autores sin embargo enumeran evidencias paleontológicas suficientes para postular que la AR ya campaba en Europa en el siglo I a.C. (11).

Durante los inicios del siglo XIX la etiología de la artritis reumatoide se debatía entre los conceptos de diátesis o desequilibrios internos y factores externos; ante la perspectiva de un agente etiológico adquirido en el nuevo mundo, la hipótesis de una etiología infecciosa en la AR cobra fuerza a principios del siglo XX pero no se encuentra una relación clara con ningún germen (12). Fueron Burnet y Mackay en los años 70 los que sentaron las bases de la etiopatogenia actual con su teoría autoinmune (13).

Otro aspecto reseñable de la historia reciente de la AR es la llamada “pirámide terapéutica”, que consistía en la adición de medicamentos en función de la gravedad y discapacidad del paciente. Previo a la aparición de la aspirina en 1870 los pacientes únicamente disponían de láudano para aliviar sus dolores. En 1948 se descubren los corticoides (14) y eclipsan los prometedores resultados de las sales de oro (15), que producían frecuentes efectos secundarios y menor eficacia respecto a los glucocorticoides. En cualquier caso, los efectos secundarios de los glucocorticoides también se hicieron evidentes tras largos periodos de tratamiento por lo que su uso se acaba restringiendo a los pacientes más graves. Además de las sales de oro, otros fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) aparecen progresivamente: salazopirina (16), cloroquina (17), hidroxiclороquina (18) y D-penicilamina (19).

El uso de fármacos citotóxicos fue liderado por el español Jiménez Díaz en 1951, buscando un efecto inmunosupresor frente al origen inmunitario de la AR (20). Bajo esta óptica la azatioprina, clorambucilo, ciclofosfamida y metotrexato empiezan a ser utilizados en la AR.

El uso de análogos del ácido fólico como la aminopterina y posteriormente el metotrexato, se impusieron en el tratamiento de la psoriasis y la AR por su perfil de toxicidad y eficacia superior a los demás; actualmente es el metotrexato el FAME más utilizado en el mundo (21), aunque por sí solo rara vez consigue la remisión completa y mantenida de la AR. Por esta razón se

ensaya el efecto aditivo de varios FAME administrados simultáneamente en las llamadas “terapias combinadas”, clásicamente metotrexato y antimaláricos (cloroquina o hidroxiclороquina) y también con salazopirina (denominada “triple terapia”); esta estrategia resulta útil, con mejoras en la eficacia y sin importantes efectos adversos adicionales (22). Durante los últimos años del siglo XX y el inicio del siglo XXI aparece la leflunomida (23) y se publican las primeras evidencias de que el uso generalizado de FAME en la AR consigue frenar la discapacidad progresiva de los pacientes (24).

Así pues la Reumatología entró en el siglo XXI dejando definitivamente atrás la poco estimulante “pirámide terapéutica” y mirando hacia un futuro tecnológico basado en tratamientos dirigidos a frenar moléculas centrales en la cascada inflamatoria, en paralelo con los avances en los mecanismos patogénicos de la AR (25).

Con la aparición de los medicamentos biológicos (26), este abordaje terapéutico resultó aún más eficaz y a día de hoy los pacientes con artritis reumatoide tienen unas perspectivas funcionales y de calidad de vida mucho mejores con el abordaje denominado “*treat to target*”, en el que el médico instauro tratamiento intensivo en las primeras fases de la enfermedad para frenar la progresión y complicaciones de la misma (27).

3. EPIDEMIOLOGÍA.

La valoración epidemiológica de la AR es compleja, empezando por el diagnóstico de la enfermedad; los criterios de clasificación han variado a lo largo del tiempo en busca de un diagnóstico más precoz y la instauración de tratamientos cada vez más eficaces de forma temprana ha mejorado el pronóstico funcional de la enfermedad. Aun así, la AR sigue siendo una enfermedad considerablemente molesta para el paciente que la padece.

3.1 DEFINICIÓN DE CASO.

Las estimaciones epidemiológicas en la AR plantean ciertos retos desde un punto de vista metodológico. Además de la ya mencionada confusión terminológica en la literatura, no existen unos criterios diagnósticos como tales en la AR, sino que se han venido utilizando criterios de clasificación; estos criterios también han cambiado a lo largo del tiempo (28), lo que ha supuesto una variabilidad considerable en la definición de caso de AR.

En 1958 se propusieron los criterios de la *American Rheumatism Association* (ARA), posteriormente modificados en 1962 para convertirse en los criterios de Roma; en estos criterios se define AR posible, probable, definida y clásica en función de los criterios clínicos que cumpliera el paciente y además define la AR activa y la AR inactiva en la que se exigían cambios radiográficos o deformidades típicas además de la historia previa de poliartritis. La diferencia fundamental entre los criterios ARA y los de Roma es que se excluyeron los criterios histológicos, que resultaban poco prácticos (Tabla 1).

Tabla 1. CRITERIOS DE ROMA

AR ACTIVA*	Rigidez matutina
	Dolor articular espontáneo o al movimiento
	Inflamación de tejidos blandos en una articulación observada por médico
	Inflamación de tejidos blandos en otra articulación observada por médico
	Inflamación de tejidos blandos en articulaciones simétricas simultáneas observada por médico
	Nódulos subcutáneos observados por médico
	Cambios radiológicos (erosiones o/y osteoporosis yuxtaarticular)
	Factor reumatoide positivo
AR INACTIVA	Historia pasada de poliartritis
	Deformidad simétrica de las articulaciones de las manos o de los pies
	Cambios radiológicos
	Factor reumatoide positivo
*AR probable: 3 o 4 criterios positivos, AR definitiva: 5 o 6 criterios positivos, AR clásica: 7 u 8 criterios positivos. AR: Artritis Reumatoide .	

Estos criterios se revisaron en 1966, y surgieron los criterios de Nueva York (29) con la intención de describir mejor cada caso activo o inactivo, pero

no ofrecían una definición clara de caso inequívoco de AR; únicamente se reportaba el número de criterios positivos en cada paciente (Tabla 2), y no tuvieron mucha aceptación.

Tabla 2. CRITERIOS DE NUEVA YORK**

Historia de artralgias en 3 o más articulaciones en miembros (IFP/MCF de la misma mano cuentan como una articulación)

Inflamación, limitación del movimiento, subluxación o anquilosis de 3 o más articulaciones en miembros y síntomas en al menos un par articular. Deben estar afectadas al menos una mano, muñeca o pie y ser simétrica en al menos un par articular

Radiología de AR erosiva (grado 2 o mayor) en manos, muñecas y pies

Reacción serológica positiva para AR.

IFP: interfalángicas proximales, MCF: metacarpofalángicas, AR: Artritis Reumatoide.

**Sin reglas para positivos, el estudio debe indicar cuántos criterios satisfacen los casos.

Ya en 1987 se publican los nuevos criterios ACR (30) en los que se incluyeron datos clínicos como la rigidez matutina y la localización de la artritis en manos (Tabla 3). Estos criterios tenían buena sensibilidad para incluir a los pacientes tanto activos como inactivos y se consideraron adecuados para estudios epidemiológicos poblacionales. Con el paso del tiempo y los avances en el tratamiento estos criterios perdieron vigencia ya que no permiten diagnosticar pacientes en fases muy tempranas de la enfermedad, lo que resulta clave para controlar los síntomas y evitar el daño estructural en la AR (31).

Tabla 3. CRITERIOS American College of Rheumatology (ACR) 1988

CRITERIO	DEFINICIÓN
Rigidez Matutina	Rigidez de más de una hora de duración hasta su máxima mejoría
Artritis de 3 o más áreas articulares	Tumefacción o derrame articular simultáneo de 3 de las 14 áreas articulares posibles: IFP, MCF, Muñecas, codos, rodillas, tobillos y MTF (derecha e izquierda)
Artritis en manos	Tumefacción de muñeca, MCF o IFP
Artritis simétrica	Afectación simultánea de las mismas áreas articulares de forma bilateral
Nódulos Reumatoides	Observados por un médico
Factor Reumatoide	Valor superior al 95% de controles sanos
Cambios radiológicos	Erosiones o descalcificación ósea inequívoca marcada en zonas clínicamente afectas

Se clasifica a un paciente como AR si cumple al menos 4 de los 7 criterios y los 4 primeros deben estar presentes al menos 6 semanas. IFP: Interfalángicas proximales, MCF: metacarpofalángicas. MTF: metatarsofalángicas.

En 2010 se publican unos nuevos criterios de clasificación ACR conjuntamente con la *European League Against Rheumatism* (EULAR) para la AR (32); estos criterios buscan características precoces de la enfermedad como la afectación de pequeñas articulaciones, autoanticuerpos, reactantes de fase aguda y una duración de los síntomas de al menos 6 semanas, e introducen el término de AR definida cuando el paciente cumple 6 puntos de 10 posibles en cualquier momento de la historia de la enfermedad (Tabla 4).

Tabla 4. CRITERIOS American College of Rheumatology (ACR) 2010

ARTICULAR	PUNTUACION
Afectación de una articulación grande	0
Afectación de 2 a 10 articulaciones grandes	1
Afectación de 1 a 3 articulaciones pequeñas	2
Afectación de 4 a 10 articulaciones pequeñas	3
Afectación de más de 10 articulaciones pequeñas	5
LABORATORIO	
FR y Anti-CCP negativos	0
FR y/o ACPA positivos a títulos bajos (<3 VN)	1
FR y/o ACPA positivos a títulos altos (>3 VN)	2
VSG y/o PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
DURACION DE LOS SINTOMAS	
< de 6 semanas	0
> de 6 semanas	1

Un paciente se clasifica como AR cuando su puntuación total es igual o superior a 6. FR: factor reumatoide. ACPA: Anticuerpos anti péptidos citrulinados. VN: valor normal. VSG: velocidad de sedimentación globular. PCR: Proteína C reactiva.

3.2 PREVALENCIA, INCIDENCIA E IMPACTO.

La AR es una enfermedad que produce una importante discapacidad y supone una carga importante para el paciente, familia y sociedad, como demuestra el análisis con respecto a la AR derivado del estudio “*Global Burden of Disease*”(GBD) de 2010 (1); la prevalencia global estimada de la AR es del 0.24%, siendo del 0.35% en mujeres y del 0.16% en hombres, con una mayor

prevalencia en el área de Australia (0.46%), seguida de Europa (0.44%) y América del Norte (0.44% en población de alto nivel adquisitivo). En el sureste asiático, este asiático y centro-este africano la prevalencia estimada fue del 0.16%. Otros autores han identificado poblaciones indígenas norteamericanas con alta prevalencia de AR, en concreto los indios Pima (33) y los Chippewa (34) con un 5.3% y un 6.8% respectivamente.

Según GBD, la AR se encuentra en la posición 42 de 269 condiciones patológicas estudiadas en términos de años vividos con discapacidad, lo que nos da una idea de la magnitud problema de salud al que nos enfrentamos cuando hablamos de la AR.

En España el estudio EPISER realizado entre 1998 y 1999, estimó una prevalencia acumulada de AR del 0.5% en mayores de 20 años, siendo del 0.6% en mujeres y 0.2% en hombres; se observó una mayor prevalencia en áreas urbanas frente a rurales, aunque la diferencia no resultó significativa. La percepción de discapacidad y disfunción resultó claramente alterada en los pacientes (35). En 2020 se publican los resultados del estudio EPISER 2016 en el que se aplican los criterios ACR de 2010, resultando una prevalencia de 0.82% frente al 0.69% que cumplían los criterios ACR de 1987 (36).

A pesar de que la prevalencia es relativamente constante a nivel mundial, el comportamiento clínico de la AR varía entre distintas poblaciones (37,38) y su incidencia puede variar en el tiempo (39). En cualquier caso, la comparación entre distintas poblaciones plantea problemas metodológicos importantes (40) y estudios comparativos del curso de la AR entre distintas etnias en el mismo contexto geográfico sugieren que las diferencias clínicas pueden deberse a factores socioeconómicos, más que a la genética o aspectos culturales (41–44).

Con respecto a la mortalidad en la AR, es un hecho conocido que los pacientes con AR mueren de forma prematura (45), sobre todo atribuida a una mayor tasa de eventos cardiovasculares, mayor tasa de infecciones, afectación pulmonar y renal que la población general y especialmente en aquellos pacientes con factor reumatoide (FR) y/o anticuerpos anti péptido citrulinado cíclico (ACPA) positivos. Un meta análisis publicado en 2013 que incluía

publicaciones de los últimos 50 años arrojó una tasa estandarizada de mortalidad en pacientes con AR de 1.47 (intervalo de confianza del 95%: 1.19-1.83); los autores encontraron una discreta reducción en la tasa de incidencia de mortalidad del 2.3% por año, aunque no se confirmó en el caso de la tasa estandarizada de mortalidad (46). En un estudio realizado en Reino Unido no encontraron una esperada reducción en la mortalidad de los pacientes con AR precoz seguidos en las últimas décadas (47), a pesar de las mejoras en el control temprano de la actividad inflamatoria de la enfermedad.

4. ETIOPATOGENIA.

La etiología de la AR es desconocida, aunque se conocen muchos aspectos acerca del desarrollo y factores de riesgo que se asocian con su aparición y progresión. Como ya se ha mencionado la AR es una enfermedad heterogénea con gran variabilidad clínica, se considera que la AR tienen una causa multifactorial que deriva en el desarrollo de la enfermedad de manera particular en cada paciente, siendo hoy en día imposible establecer la causa exacta en cada individuo.

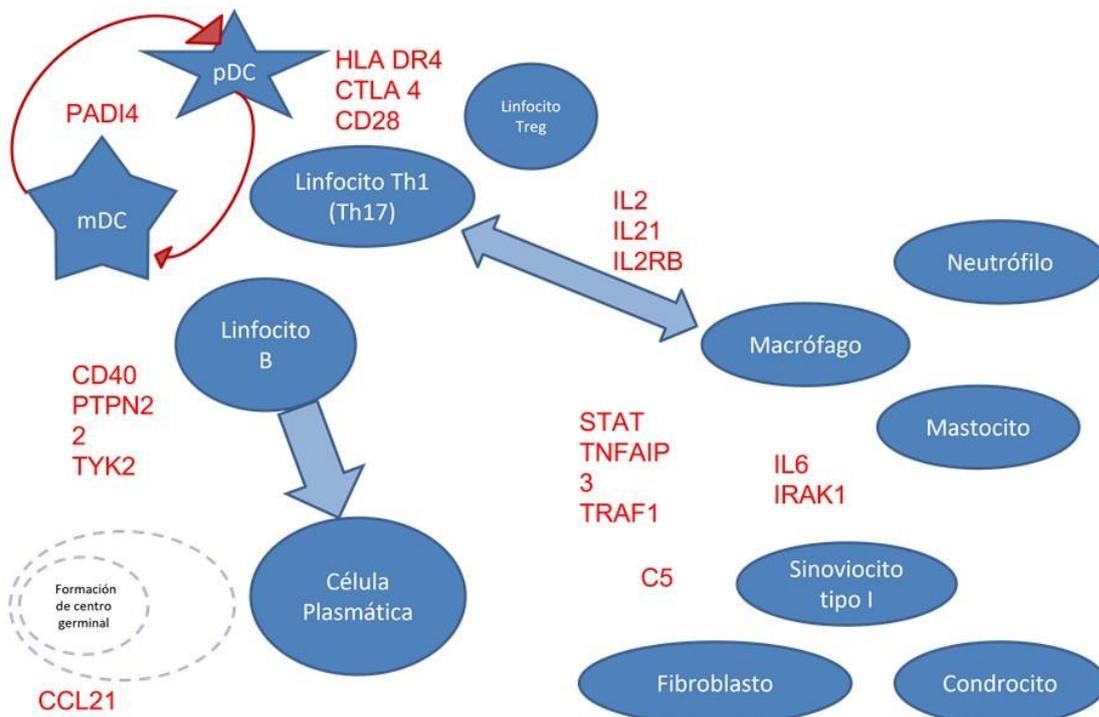
4.1 GENÉTICA.

El riesgo de padecer AR está aumentado en pacientes con historia familiar de AR entre 2 y 4 veces y existe mayor concordancia entre gemelos, lo que indica que hay factores genéticos implicados en su patogenia (48). La heredabilidad de la AR se estima en torno al 40% y es más acusada en pacientes seropositivos que en pacientes seronegativos (49).

Aproximadamente el 50% del riesgo genético se localiza en el cromosoma 6, en concreto se asocia a diferentes locus del HLA.

El 50% restante del riesgo genético se localiza en locus distintos al HLA, pero su asociación es más bien individual o acumulativa, se han encontrado genes relacionados con las vías de coestimulación celular, señalización de citoquinas, el umbral de activación de linfocitos o la activación de la inmunidad innata. (Figura 1).

FIGURA 1. LOCUS DE RIESGO PARA ARTRITIS REUMATOIDE



Adaptada de Smolen J. Lancet 2016. mDC: célula dendrítica mieloide. pDC: célula dendrítica plasmocitoide. Th1: célula T colaboradora 1, Th17: célula T colaboradora 17. Treg: célula T reguladora.

4.2 EPIGENÉTICA.

La epigenética estudia los procesos post transcripcionales que modifican la expresión génica. Un mecanismo fundamental es la metilación de fragmentos de ADN a través de modificaciones en las histonas (metilación, acetilación, fosforilación); mediante esta metilación en determinados

segmentos de ADN se regula la transcripción, replicación, recombinación y respuesta al daño de ADN, así como a la remodelación de cromatina. También fragmentos de ARN mensajero no codificantes (ncRNAm) regulan la expresión de genes. Se han observado patrones alterados de metilación de ADN y ncRNAm en pacientes con AR.

La epigenética se ve influenciada por factores ambientales como el tabaco en el caso de la fosforilación de histonas. Es un campo prometedor para entender la sinergia de factores genéticos y ambientales en la patogenia de la AR, así como una posible vía terapéutica si se consiguen fármacos reguladores de estos procesos (50).

4.3 FACTORES AMBIENTALES.

Existen factores ambientales claramente relacionados con la aparición de la AR, entre los que destacan el tabaquismo, el bajo nivel socioeconómico o la exposición a sílice. Las infecciones se han propuesto de forma recurrente como mecanismo plausible sobre todo a través de mecanismos de mimetismo molecular. La enfermedad periodontal está relacionada con la aparición de la AR y aunque no se conoce el mecanismo exacto se postula que pueda deberse a la aparición de proteínas citrulinadas en el proceso de lucha contra el germen implicado (51).

Como en otras enfermedades autoinmunes el papel de la flora intestinal ha adquirido un considerable interés como factor de riesgo y progresión de la AR, aunque no se conoce completamente el mecanismo ni el papel que puede tener en la prevención o tratamiento de la enfermedad (52).

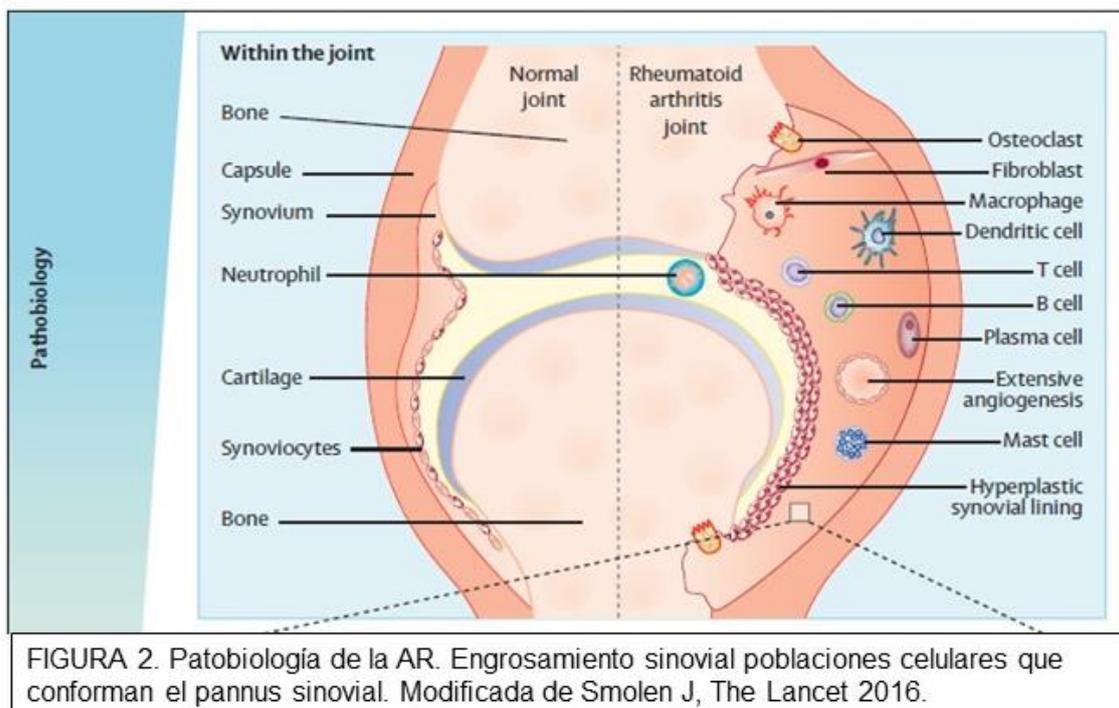
4.4 INMUNIDAD Y ARTRITIS REUMATOIDE.

Los procesos inmunes en la artritis reumatoide son prominentes y afectan tanto a nivel articular como sistémico. El proceso inflamatorio es importante y

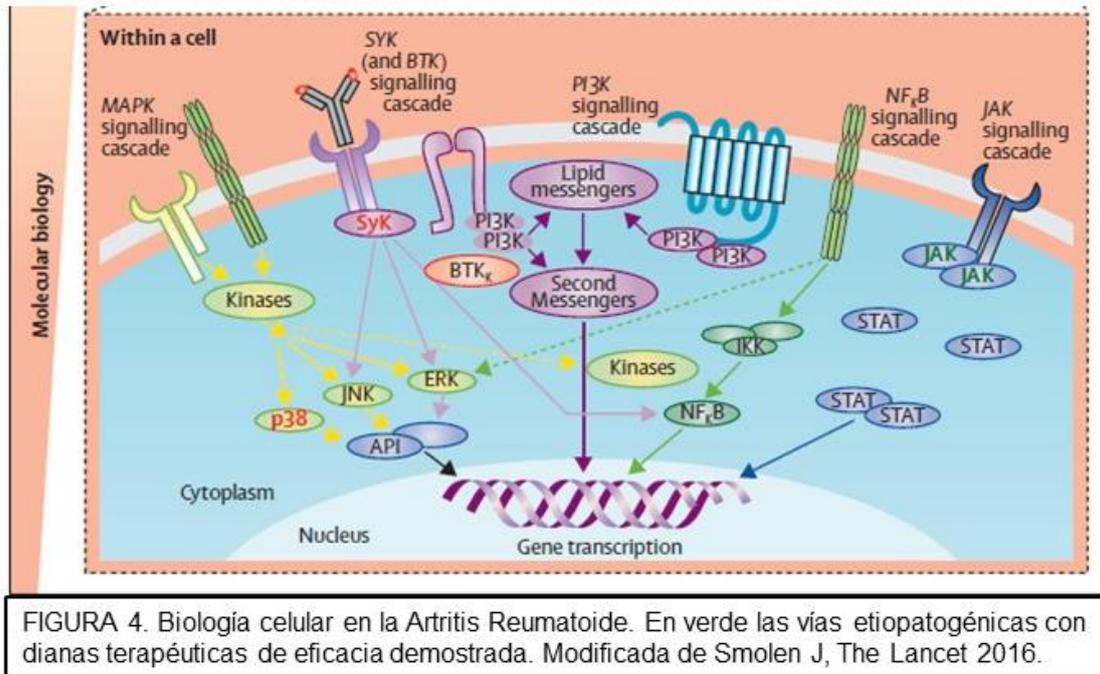
también se produce activación de la inmunidad con participación de varios tipos celulares que se relacionan entre sí.

4.4.1 Inflamación.

La tumefacción articular que se observa en los pacientes con AR se debe a inflamación de la membrana sinovial por activación inmune, con infiltración de leucocitos en un tejido normalmente hipocelular. Las poblaciones celulares observadas incluyen tanto células de la inmunidad innata (monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células natural killer,...) como de la inmunidad adaptativa (células T helper 1 y 17, células B, plasmocitos, plasmablastos,...) y se ha observado heterogeneidad entre los distintos pacientes e incluso entre especímenes de biopsia de un mismo paciente (53,54). Se han sugerido distintos patrones de inflamación según la predominancia celular (fibroblástica, mieloide o linfocítica) que podrían tener distinto comportamiento en cuanto a su capacidad destructiva articular, lo que podría explicar la heterogeneidad clínica entre pacientes. Figura 2.



El infiltrado inflamatorio está controlado por un complejo sistema de citoquinas y quimioquinas, siendo fundamentales el TNF α , la Interleucina 6 y el factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (55). Las citoquinas agravan el proceso mediante la activación de células endoteliales y la



Por tanto y a modo de resumen podemos decir que en la patogenia de la AR existe una fase preclínica en la que fundamentalmente se producen procesos relacionados con la inmunidad innata (infección, periodontitis,...) y factores ambientales (tabaco, sílice, microbiota,...) que interactúan con un individuo genéticamente predispuesto y acaban induciendo una respuesta adaptativa más elaborada con la producción de autoanticuerpos y participación de células presentadoras de antígeno, linfocitos B, linfocitos T en el seno del estroma sinovial y linfático que inducen el desarrollo y progresión de la enfermedad reumatoide articular y extraarticular.

4.4.2 Autoinmunidad.

La presencia de autoanticuerpos, principalmente factor reumatoide y anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico, ocurre en el 50-70% de los pacientes con AR; predicen la evolución a AR en pacientes con artritis indiferenciada y se asocian a un curso de la enfermedad más agresivo con mayor daño articular y mortalidad. Más recientemente se han identificado anticuerpos contra proteínas carbamiladas y acetiladas en relación con la AR pero no mejoran la sensibilidad al diagnóstico y suelen asociarse tanto con el FR como con los ACPA, aunque son familias independientes (57).

La sensibilidad es similar entre FR y ACPA (67% vs 69%) mientras que los ACPA son más específicos que el FR (95% vs 85%) cuando se comparan con controles sanos (58).

La presencia de otros autoanticuerpos como anticuerpos no órgano específicos (ANOEs) y anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENAs) no tienen una asociación con la AR, aunque se estudian en muchos pacientes como parte del proceso diagnóstico diferencial y para descartar asociación con otras enfermedades autoinmunes sistémicas.

4.4.2.1 Factor Reumatoide.

El FR es un autoanticuerpo que reacciona contra la fracción constante de la inmunoglobulina G y fue el primer autoanticuerpo descrito en asociación con la AR. A pesar de su falta de sensibilidad se considera útil para el diagnóstico de la AR cuando la probabilidad previa a la prueba es alta.

Además de en la AR, el FR se ha identificado en enfermedades reumáticas como lepra, kala-azar, sífilis, tuberculosis pulmonar, hepatopatía crónica y sarcoidosis, así como en otras enfermedades reumáticas como lupus eritematoso sistémico o síndrome de Sjögren. Entre el 1.3 y el 4% de la población sana caucásica puede tener FR positivo. También puede aparecer en procesos infecciosos, donde podría ayudar al aclaramiento y respuesta adaptativa a la infección a través de la fagocitosis de patógenos por linfocitos B con FR en superficie (59).

Un aspecto interesante recientemente dilucidado es por qué el FR circulante no se une a los anticuerpos IgG del suero; esto ocurre porque el FR se une específicamente a anticuerpos que han fijado previamente a su antígeno. Esto implica cambios conformacionales en la inmunoglobulina cuando se une a su antígeno, exponiendo epítomos no accesibles previamente, que además mejoran la respuesta inmune (60).

En los pacientes con AR, el FR se produce y se concentra en el líquido sinovial y aunque puede ser de cualquier isotipo, los más específicos y patogénicos en la AR son el isotipo IgM e IgA (61).

Su papel patogénico principal consiste en la formación de inmunocomplejos, con capacidad para activar el complemento, macrófagos y estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias. Su afección por la fracción IgG1 hace que en presencia de anticuerpos ACPA se formen inmunocomplejos FR-ACPA, estimulando el efecto proinflamatorio de éstos últimos (62).

4.4.2.2 Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico (ACPA).

Los anticuerpos ACPA reaccionan contra residuos citrulinados de diversas proteínas como vimentina, fibronectina, histonas, o colágeno tipo II; son patogénicos vía activación macrofágica o activando osteoclastos y también pueden formar grandes inmunocomplejos que eventualmente se pueden unir al FR amplificando la respuesta inmune. Al igual que el FR pueden ocurrir múltiples isotipos, principalmente IgM, IgG e IgA,

La citrulinización o deiminación de proteínas la produce la enzima peptidylarginina deiminasa (PAD) en un proceso dependiente de calcio que transforma arginina en citrulina (Figura 5). Este proceso es irreversible y confiere a la proteína citrulinada un cambio en su carga e inestabilidad estructural que se puede asociar con una pérdida de su forma, función y desencadenar una respuesta inmune (63,64).

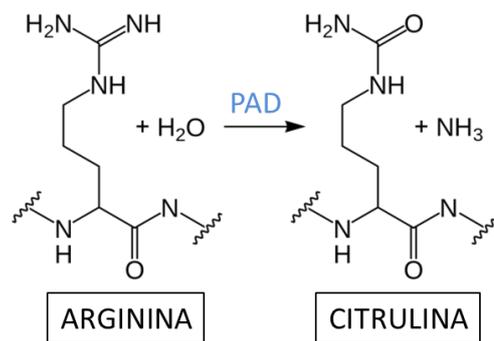


FIGURA 5. Deiminación o Citrulinización.
PAD: peptidylarginina deiminasa

Algunos estímulos patogénicos que impliquen la lisis de la membrana leucocitaria vía leucotoxinas formadoras de poros, como la leucotoxina A, producen una activación incontrolada de PAD en mucosas (oral, intestinal, urotelial o respiratoria), con generación de abundantes proteínas citrulinadas que iniciarían el proceso autoinmune (65,66). A pesar de esto, los ACPA

reaccionan sólo contra algunas de estas proteínas citrulinadas y no se conoce exactamente cómo se producen los anticuerpos; una teoría propone que la citrulinización aberrante y descontrolada generaría neo-epítomos concretos que induzcan la formación de anticuerpos (67); estos anticuerpos podrían activar componentes membrano-líticos del huésped (como el complejo de ataque de membrana del complemento o la perforina) en las articulaciones, perpetuando el estímulo citolítico que activa PAD y la citrulinización (68) (Figura 6).

En el líquido sinovial de pacientes con AR se han identificado PAD activadas y más de 100 proteínas citrulinadas intra y extracelulares diferentes, que componen el llamado citrulinoma (69). Los sinoviocitos derivados del fibroblasto (tipo I), monocitos y neutrófilos son células que contienen PAD y contribuyen a la generación del citrulinoma en la AR.

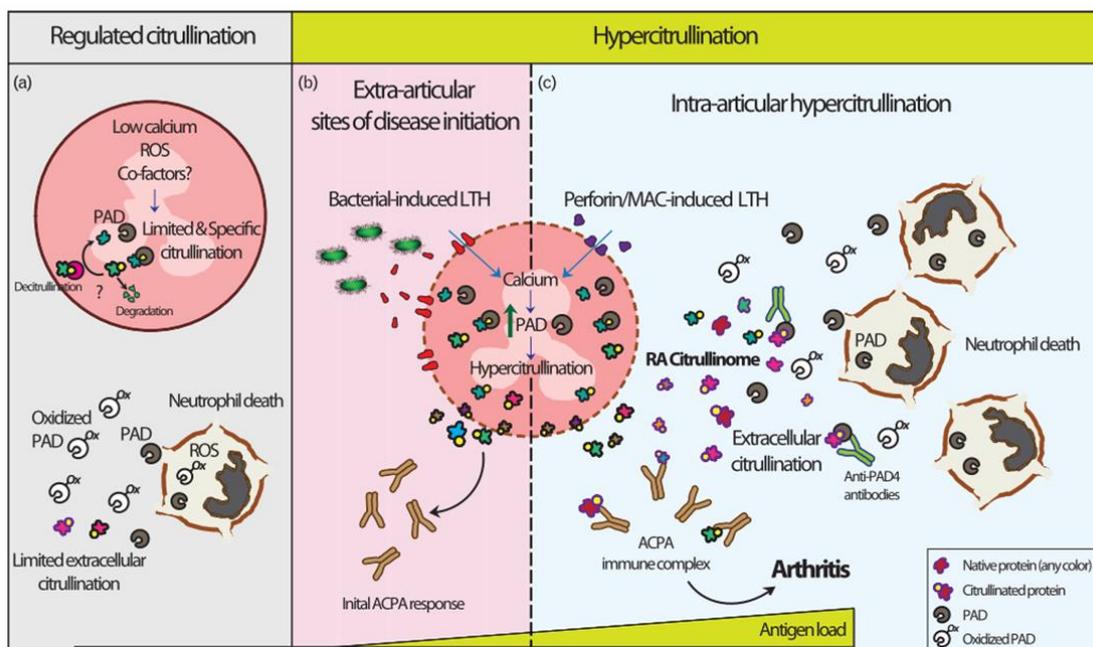


FIGURA 6 (a): En condiciones fisiológicas la citrulinización está limitada y ayuda a la degradación y desactivación de proteínas. (b) Leucotoxinas bacterianas inducen la activación descontrolada de PAD con hiper-citrulinización y respuesta inicial con generación de anticuerpos anti péptido citrulinado (ACPA). (c) Los ACPA inducen citrulinización intra articular a través de leucotoxinas endógenas (perforinas y complemento) aumentando la carga antigénica y de ACPA. Modificada de Darrah E., Curr Op Rheumatol 2018.

Los ACPA se pueden detectar hasta 10 años antes del desarrollo de la enfermedad y durante ese tiempo la especificidad antigénica se amplía, lo que implica necesariamente la participación del linfocito T y, aunque no se conoce

con exactitud su papel, se pueden detectar linfocitos T activados en tejido sinovial y en ganglios linfáticos en AR precoz (70,71). Los linfocitos B productores de ACPA se pueden detectar tanto en la sinovial como en sangre periférica (72).

Recientemente se ha observado en el dominio V de los ACPA la presencia de áreas de glicosilación extensiva, ausentes en los isotipos IgM y predictivos del desarrollo de AR, que además están relacionados con la presencia de epítipo compartido en el HLA de clase II (73).

4.4.3. Artritis Reumatoide Seronegativa.

Como se ha mencionado, aproximadamente el 30 % de las AR no presentan autoanticuerpos específicos. En estos pacientes se han observado algunas diferencias respecto a pacientes con FR o ACPA positivos en cuanto a genética, factores de riesgo ambiental, clínica, histología, perfil de citoquinas, una mayor destrucción articular sin tratamiento y también respecto a la respuesta a algunos tratamientos. Estas diferencias han llevado a postular que este grupo de pacientes padecen una enfermedad diferente (74).

Sin embargo, no existen unas recomendaciones diferentes para el tratamiento inicial de pacientes seropositivos o seronegativos y con las nuevas estrategias terapéuticas ya no se observan diferencias significativas en el curso clínico de estos pacientes (75), salvo quizás por una posible mayor probabilidad de alcanzar la remisión sin tratamiento en los pacientes seronegativos.

4.4.4. Células Natural Killer.

Las células Natural Killer (NK) se definieron tras su identificación en los años 1970 como linfocitos grandes granulares del sistema inmunitario innato, involucradas en la primera defensa contra células sometidas a estrés, como infecciones bacterianas, víricas o la transformación maligna. Actúan eliminando sin sensibilización previa a las células diana o produciendo una gran cantidad y variedad de citoquinas y quimioquinas que participan en el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa hacia un antígeno específico.

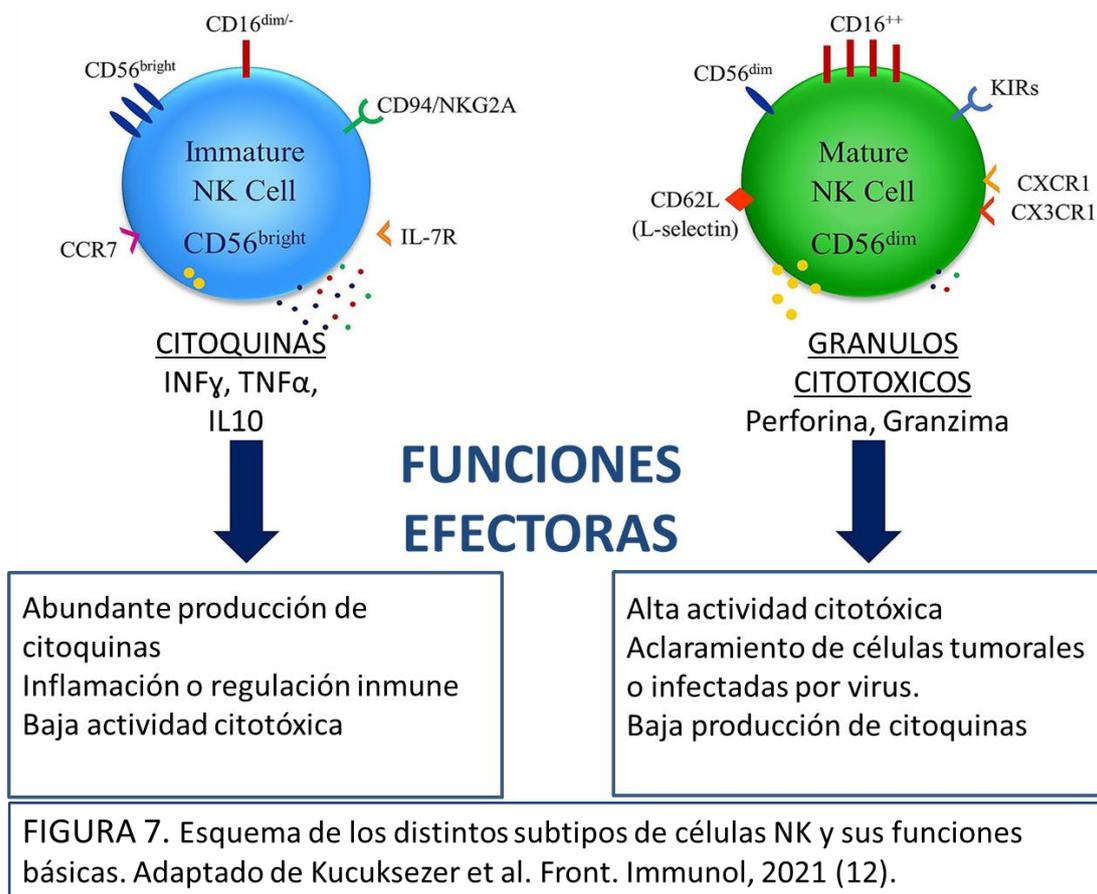
Las células NK derivan de células progenitoras del sistema hematopoyético de la médula ósea y suponen entre el 5-10 % de los linfocitos circulantes; forman parte del grupo de Células Linfoides Innatas (ILCs) con importantes funciones efectoras y reguladoras en inflamación, respuesta inmune y reparación tisular, así como una conocida capacidad para formar un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (76). En concreto formarían parte del grupo 1 de ILCs, implicados en procesos inflamatorios mediante la secreción de interferón gamma, TNF alfa y son estimuladas por IL-15, IL-12 e IL-18 mediante la activación del factor de transcripción t-bet. Derivan de un progenitor linfoide común a linfocitos B, T, célula dendrítica y otros ILCs; salen de la médula ósea en estado inmaduro y precisan de contacto celular con células estromales de tejidos o ganglios linfáticos para su maduración.

En sus estadios madurativos finales se pueden diferenciar dos subgrupos fundamentales de células NK en función de la expresión de CD56: las CD56^{bright} cuando presenta alta expresividad y CD56^{dim} cuando pierden esta alta expresividad y sin embargo tienen alta expresión de CD16. Las funciones de estos subtipos son también diferentes: CD56^{bright} actúan como ILCs reguladoras con capacidad para secretar citoquinas y con baja actividad citotóxica, mientras que CD56^{dim} actuarían como células citotóxicas frente a dianas celulares, con capacidad limitada para producir citoquinas (Figura 7).

Inicialmente se pensó que las células NK eran células efectoras de vida media limitada o corta pero también han mostrado características de inmunidad adaptativa, como la expansión de poblaciones frente a patógenos específicos, la generación de células memoria y la capacidad para mejorar la respuesta inmune secundaria frente a estímulos específicos repetidos (77).

A diferencia de los linfocitos T o B del sistema inmunitario adaptativo, la conformación de la línea germinal de las células NK no conlleva reordenamientos genéticos como los que presentan los genes del receptor de la célula T (TCR) o los de las inmunoglobulinas. La respuesta de la célula NK va a depender de la interacción de multitud de señales activadoras e inhibitoras que proceden de sus múltiples receptores de superficie que

reconocen moléculas HLA de clase I, moléculas semejantes a HLA de clase I y moléculas no relacionadas con el HLA.



La interacción de la célula NK con las células de su entorno a través del HLA de clase I es fundamental para que éstas maduren, y lo hacen cuando reciben señal inhibidora potente a través de dos tipos de receptores: NKG2A/CD94 (receptor inhibidor tipo lectina) que interactúan con HLA-E produciendo una señal inhibidora fuerte, y KIRs. Ambos tipos de receptores tienen versiones activadoras e inhibidoras, aunque en el caso de los humanos serán los KIRs los que presenten mayor variabilidad y procesos de reordenación genética, lo que los convierte en candidatos ideales para estudio en esta tesis junto con los diferentes alelos HLA de clase I clásicos.

Algunos estudios apuntan a la importancia de las células NK en la Artritis Reumatoide; en concreto se ha visto que hay un aumento de células NK en sangre periférica y en líquido sinovial de pacientes con AR activa y que estas células tienen capacidad para inducir una respuesta proinflamatoria, activar fibroblastos, osteoclastogénesis y destrucción ósea (78). También se ha

observado una elevación de IL-15 en pacientes con AR, estrechamente relacionada con la activación y proliferación de células NK (79).

4.4.5 HLA y enfermedad.

Los organismos multicelulares tienen la capacidad de eliminar los agentes extraños a través de anticuerpos, células especializadas y otros factores solubles; esta capacidad es fundamental para la supervivencia.

Los tejidos y células propias poseen esta capacidad porque expresan una serie de moléculas codificadas por genes CMH, que a su vez son reconocidos por receptores del sistema inmunitario. El CMH en humanos se denomina HLA (Human Leukocyte Antigen o antígeno leucocitario humano), y está constituido por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 dentro de la región 6p21.3.

El HLA es la región del genoma que genéticamente se asocia a un mayor número de enfermedades, sobre todo relacionadas con la autoinmunidad, pero también con infecciones. En el HLA humano hay más de 250 genes y al menos 50 de ellos tienen funciones inmunitarias, que incluyen: tres locus clásicos y no clásicos de clase I con muchos pseudogenes; cuatro locus clásicos y dos no clásicos de clase II, cada uno con dos genes (cadenas α y β); cuatro componentes del complemento; dos reguladores inmunes; diez genes implicados en inflamación o activación de células NK; tres genes relacionados con respuesta al estrés; seis genes implicados en la maduración leucocitaria; cinco genes codificantes de elementos de procesamiento antigénico y así sucesivamente (Figura 8).

Las regiones HLA de clase I y II engloban genes altamente polimórficos que codifican proteínas especializadas en la presentación de antígenos. Cuando estos complejos se expresan en membrana celular son reconocidas por los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, a través de su receptor clonotípico TCR. Además de la región polimorfa (región $\alpha 1$), el HLA posee dominios no variables que interactúan con el receptor de la célula inmunológica y también pueden tener un papel en la respuesta inmune.

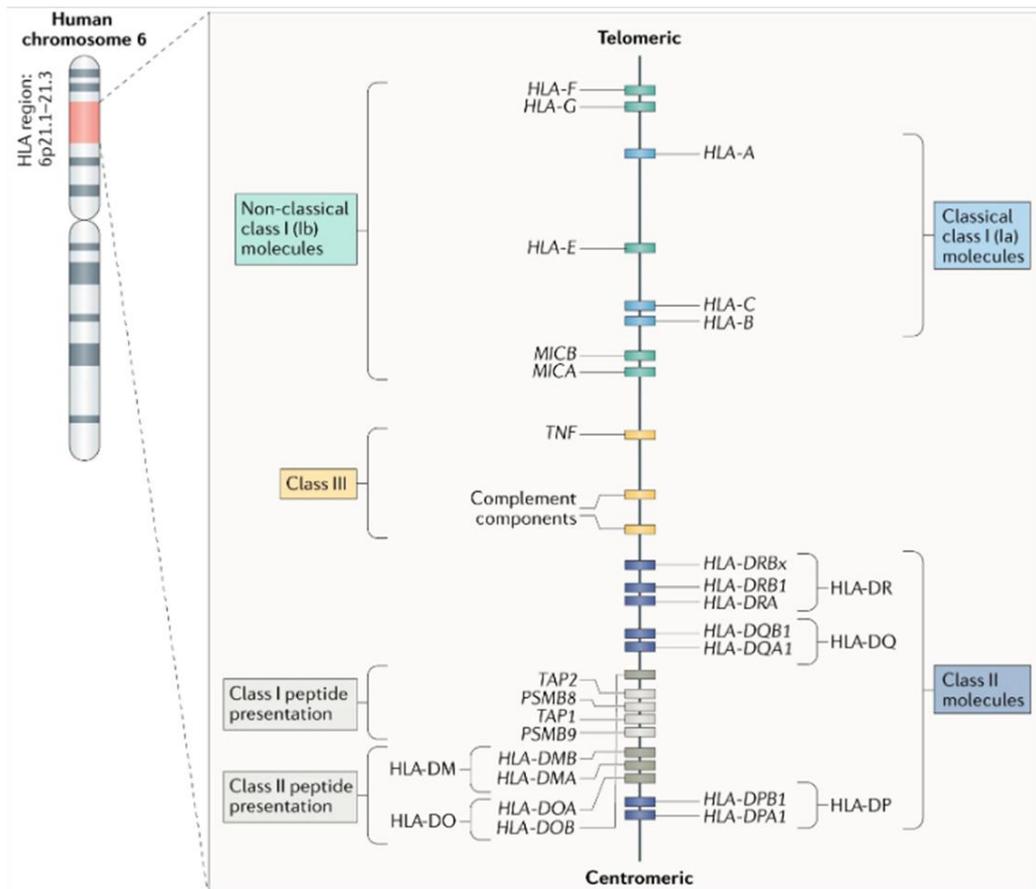


FIGURA 8. Región HLA. Adaptada de Busch R., Nature Reviews Immunology 2019.

Las moléculas HLA de clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas, y son las encargadas de presentar a los linfocitos T CD8+ los antígenos que provienen de proteínas citosólicas, propias o codificadas por virus.

Las moléculas de clase II se expresan constitutivamente en las células presentadoras de antígenos (células del epitelio tímico, células dendríticas, macrófagos, y células B activadas), y son las encargadas de presentar fragmentos proteicos externos que provienen de la endocitosis (de la incorporación intracelular de material externo) después de un procesamiento intracelular (80).

4.4.5.1 HLA de clase I.

Las moléculas de clase I obtienen su péptido del citosol de la misma célula que lo va a expresar. El inmunoproteasoma se ocupa de degradar

péptidos citosólicos de una manera particular (con residuos hidrofóbicos en extremo C terminal) que facilitará su ensamblaje posterior una vez transportado al retículo endoplásmico por las proteínas TAP (*transporter associated with antigen processing*). Estas proteínas TAP (heterodímero formado por TAP1 y TAP2) formarán parte del complejo proteico de ensamblaje donde se cargarán los péptidos al HLA de clase I, junto con dos chaperones generales de plegado, ERp57 y calreticulina, y tapasina (un chaperón dedicado a HLA de clase I). Después de asociarse a calnexina, los complejos HLA de tipo I vacíos son incorporados al complejo de ensamblaje, donde tapasina ejerce de palanca para cargar de manera eficaz el péptido seleccionado con alta afinidad para el HLA. Existen mecanismos de carga de péptido en ausencia de tapasina, aunque el péptido incorporado no estará tan bien seleccionado. Posteriormente el HLA cargado con su péptido alcanza la superficie celular para su presentación a células T (81,82). (Figura 9)

En el caso de que la célula tenga alguna dificultad (infectada por un patógeno, neoplásica...), aparecerán proteínas alteradas en su citosol y a través del mecanismo descrito acabarán siendo presentados en la superficie celular y reconocidos como extraños por el receptor TCR de las células T CD8 citotóxicas.

El HLA de clase I también interactúa con receptores de células con capacidad citotóxica (NK, NK-T y linfocitos T CD4+, CD28null, fundamentalmente a través de receptores inhibitorios de la familia de las lectinas tipo C (CD94/NKG2) y receptores relacionados con la superfamilia de las inmunoglobulinas (*Killer Immunoglobulin Receptor* o KIR).

Como se ha mencionado, dentro del HLA de clase I existen tres locus clásicos (A, B y C) y tres locus no clásicos (E, F y G).

La presencia de tres isotipos clásicos de HLA de clase I, con distintas características a la hora de cargar péptidos, garantiza que distintos patógenos con diferentes estrategias de codificación proteica puedan ser detectados. Variantes genéticas en el HLA-B y HLA-A se asocian a diversas patologías como la espondilitis anquilosante, la enfermedad de Bechet, coriorretinitis o respuesta a diversos virus. Evolutivamente, los primates catarrinos (incluidos

los humanos) han hipertrofiado el sistema HLA-C/KIR y es preferente en los mecanismos de tolerancia inmunológica a través de las células NK (83).

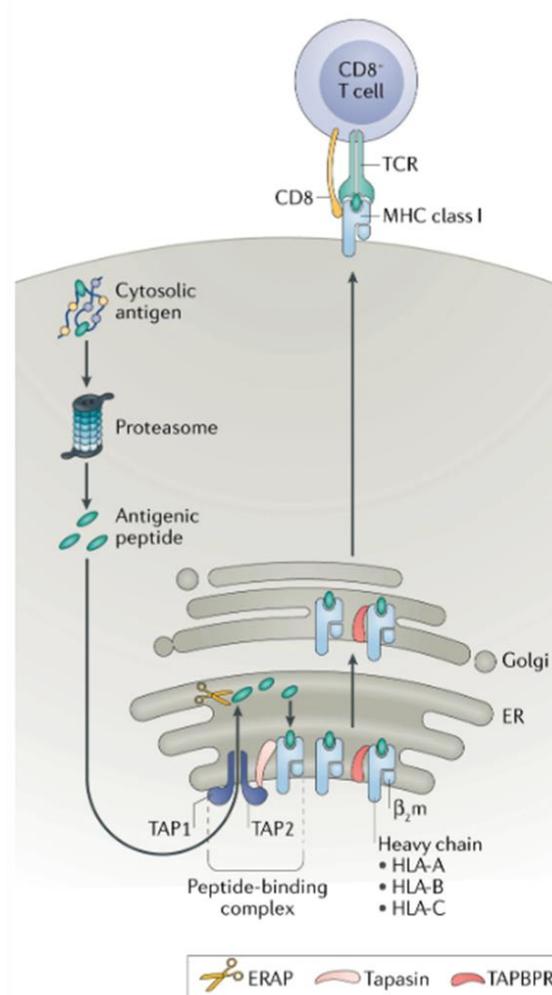


FIGURA 9. HLA de clase I. Adaptada de Busch R., Nature Reviews Immunology 2019.

Los locus no clásicos muestran poca variabilidad genética, por lo que están limitados en la cantidad de péptidos que pueden cargar, actuando preferentemente como una señal estable en la membrana celular que inhibe la lisis por las células inmunes (84,85); si un virus altera la expresión de HLA de clase I se podría detectar por la ausencia de HLA-E en superficie. La función de HLA-F y G es menos conocida, pero está relacionada con la tolerancia materno fetal durante la gestación.

En el HLA de clase I también se encuentran genes de riesgo para AR, más concretamente en el locus C (4), y configura uno de los aspectos fundamental de la presente tesis.

4.4.5.1.1 HLA-C.

El HLA-C surge filogenéticamente de la diferenciación de un ancestro HLA-B, con el que está relacionado, después de la separación de los ancestros de homínidos y monos Rhesus, como ya se ha comentado. En humanos el HLA-C es el locus más importante para el control de la biología de la célula NK, a través de sus receptores KIR (86).

Existen dos grupos de ligandos para receptores KIR en función del aminoácido presente en la posición 80 de la hélice α -1 de la molécula de HLA de clase I (87).

- El grupo C1 se caracteriza por presentar el aminoácido asparraguina (Asn) en la posición 80 e incluye a los alelos HLA-Cw *01, *03, *07, *08, *12, *14 y *16:01.
- El grupo C2 presenta lisina (Lys) en la posición 80 y engloba a los alelos HLA-Cw *02, *04, *05, *06, *15, *16:02, *17 y *18.

Cada grupo (C1 y C2) se une específicamente a un tipo de receptor KIR diferente en función de otros polimorfismos presentes en los distintos receptores KIR, haciendo que esta interacción HLA-KIR sea variable y compleja.

El nivel de expresión de HLA-C en superficie celular es variable y se ha asociado con una mayor actividad citotóxica de células T en respuesta al virus VIH y a un mayor riesgo de padecer enfermedad de Crohn (88); además se ha observado que la mayor expresión de HLA en superficie no indica mayor variabilidad antigénica, sino que se produce una restricción de antígenos, lo que podría representar una mayor focalización para mejorar la respuesta al patógeno o iniciar procesos inmunes (89).

4.4.6 Receptores KIR.

Los receptores KIR son codificados en el cromosoma 19q13.14, en el llamado complejo de receptor leucocitario (LCR). El complejo de genes KIR está constituido por 14 genes polimórficos y 2 pseudogenes, de los que 4 codifican para receptores con 3 dominios de Ig (genes KIR3D) y 10 codifican

para receptores con dos dominios de Ig (genes KIR2D). Los receptores resultantes son parecidos en cuanto a estructura, aunque presentan diferencias en cuanto a expresión en superficie, unión a ligando y señalización intracelular (90).

Se caracterizan por gran variabilidad génica y alélica y por interactuar con moléculas de HLA de tipo A, B y C. Básicamente el locus tiene cuatro alelos constantes y varios genes homólogos que varían entre individuos, de forma que cada individuo puede poseer entre 9 y 17 genes en su genoma con distintas posibilidades combinatorias, lo que genera una gran diversidad haplotípica. Además, de cada gen KIR se han descrito entre 33 y 184 alelos diferentes como consta en <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/about/statistics/> en septiembre de 2022.

Los receptores KIR se nombran en función del número de dominios (2D para dos dominios, 3D para 3 dominios o P en el caso de pseudogenes) y también en función de su dominio o cola intracelular que será la que producirá fundamentalmente el efecto inhibitorio cuando es larga (L) frente a la corta (S) que será inhibitoria débil o activadora.

La gran variabilidad entre los receptores resultantes hace que se hayan dividido en dos haplotipos funcionales, A y B.

- El haplotipo A contiene 9 genes (3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2) y se observa en todas las poblaciones siendo algunos individuos homocigotos.
- El resto de haplotipos se agrupan de forma genérica en el haplotipo B, que posee algunos genes siempre ausentes en el haplotipo A (2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL2, 2DL5 y 3DS1) (91–93).

Como se puede apreciar, el haplotipo A contiene un mayor número de genes inhibitorios con dominio intracelular largo (L) en comparación con el haplotipo B. El humano puede por tanto tener un repertorio limitado de genes KIR principalmente inhibitorios si posee un genotipo AA, mientras que tendrá un repertorio más completo de genes KIR activadores e inhibidores en el caso de presentar un genotipo AB o BB. Se diferencia además una región

centromérica y otra telomérica, susceptibles de recombinación genética. La mayoría de los individuos caucásicos (aproximadamente el 55%) tienen un haplotipo A, que presenta una heredabilidad mucho más constante con pocas variaciones, mientras que el haplotipo B es mucho más variable; a esto podemos añadir el número de copias de cada gen que hereda el individuo, lo que aumenta el número de diferentes haplotipos posibles (94). Al igual que los genes KIR, los haplotipos KIR varían notablemente entre diferentes grupos poblacionales (95).

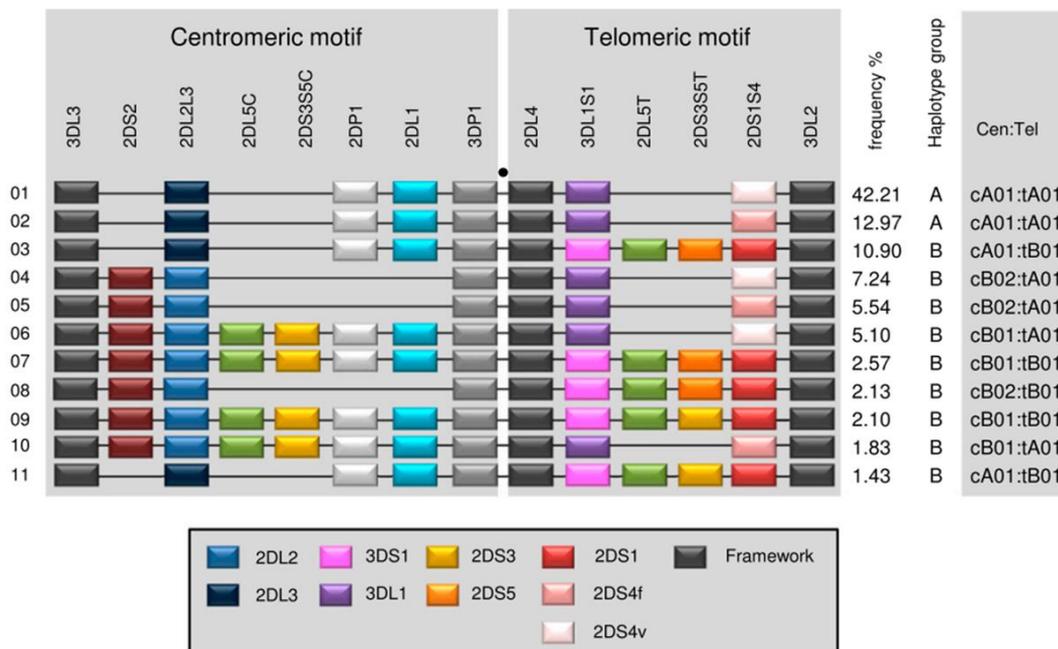


FIGURA 11. Haplotipos KIR Frecuentes. Los genes en gris forman el “armazón” constante sobre el que se produce la recombinación genética. El haplotipo (haplotype group) se forma por una región telomérica y otra centromérica con sus genes específicos. La frecuencia (frequency %) corresponde a población caucásica. Modificada de Wei Jiang et al. Genome Res. 2012;22: 1845-1854.

Los receptores KIR tienen afinidad por moléculas HLA de tipo I y fundamentalmente HLA-C. Todos los HLA-C tienen valina (val) en posición 76 y varían como ya se ha comentado en la posición 77 y 80 (grupo C1 y grupo C2).

También HLA-B y A son ligandos de KIR, específicamente aquellos alelos que presentan el epítipo Bw4, que viene definido por el aminoácido presente en la posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (96). El epítipo Bw4 está presente en varios alelos HLA-B (*05, *5102, *13, *17, *27, *37, *38, *44, *47, *49, *51, *53, *57, *58, *59, *63 y *77) y

algunos alelos HLA-A (*09, *23, *24, *2403, *25, *32). Aquellos alelos que no presentan el epítipo Bw4 corresponden al llamado epítipo Bw6.

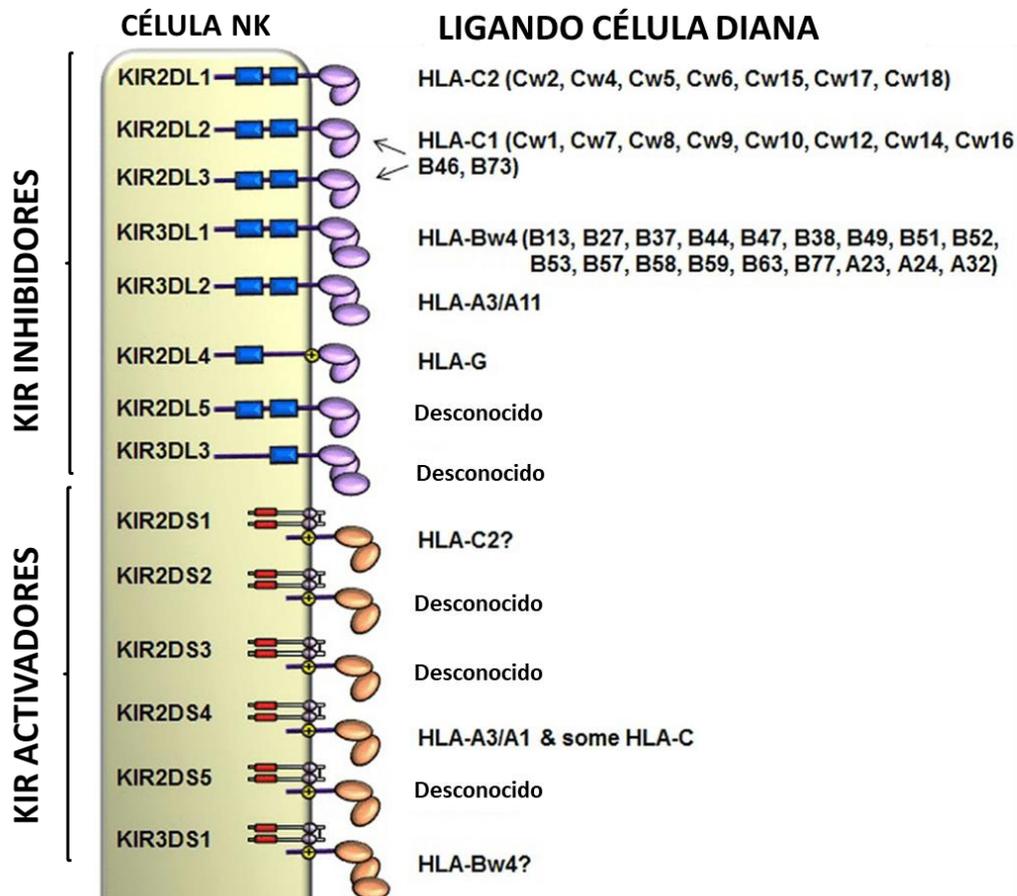


FIGURA 12. Receptores y ligandos KIR. Modificada de Rajalingam R, *Frontiers Immunology* 2016.

Cada receptor KIR presenta afinidad por diferentes ligandos HLA, lo que complica aún más esta interacción (97) (Figura 12). Por si fuera poco, aquellos KIR que no presentan afinidad por moléculas HLA pueden interactuar con otros ligandos más universales como los carbohidratos del glicocálix celular y el tejido conectivo. Dentro de ellos los glucosaminoglicanos, y en particular el heparán sulfato, presenta una estructura variable dependiendo del contexto biológico durante su síntesis y del tipo celular, lo que le convierte en un biopolímero de gran importancia en procesos biológicos fundamentales (98). Entre los KIR que se pueden unir a heparán sulfato, se ha demostrado la interacción primero de KIR2DL4 (el único KIR con motivo intracelular largo y

capacidad activadora) (99) y posteriormente de KIR3DS1 y otros KIR que portan el dominio proteico D0 en su estructura como KIR2DL5, 2DL4, 3DL1, 3DL2 o 3DL3 (100).

Además, se ha observado que el nivel de expresión de HLA-C regula el número y función de las poblaciones de células NK, ampliando la biología de esta interacción (101).

4.4.7 Binomio HLA-C/KIR.

Como se ha mencionado previamente en humanos el sistema HLA-C/KIR ha sido favorecido evolutivamente en el reconocimiento de lo propio y lo ajeno en lo que respecta a respuestas citotóxicas sin sensibilización previa.

La gran variabilidad en ambas partes del binomio hace que la respuesta de la célula NK sea muy diversa entre individuos, prácticamente individualizada en función de la combinación HLA-C/KIR del sujeto. Ciertas combinaciones de HLA-C/KIR se han asociado a determinadas respuestas a infecciones (102,103), susceptibilidad para desarrollar enfermedades autoinmunes (104,105), supervivencia del trasplante de órgano sólido (106) o médula ósea (107) y éxito reproductivo (108).

4.4.7.1 HLA-C/KIR en la Artritis Reumatoide.

La posible implicación del binomio HLA-C/KIR en la AR se apoya en la presencia de receptores KIR en linfocitos CD8+, linfocitos CD4+ CD28null, y células NK. La estimulación celular vía KIR podría ser responsable de la expansión clonal de la población CD4+ CD28null observada en pacientes con AR (109); la presencia de estas células se ha relacionado con la presencia de nódulos reumatoides, la aparición de vasculitis reumatoide o daño orgánico extraarticular (110). Se ha reportado asociación de la artritis reumatoide con HLA-C*05 y ausencia de HLA-C*04. La presencia de vasculitis reumatoide se ha asociado además a la presencia de HLA-C*03, *05 y KIR2DS2 (111,112) en caucásicos mientras que otro estudio en población brasileña señaló el HLA-C*08 como factor protector de vasculitis en pacientes con AR (113).

En un estudio extenso sobre población china, el polimorfismo rs12191877 C/T en HLA- C se asoció con menor riesgo de padecer AR (114). En otro estudio taiwanés, la frecuencia de KIR2DS4, independientemente de su correspondiente ligando HLA-Cw4, apareció elevada en pacientes con AR respecto a controles (115). En un estudio iraní se identificaron como protectores para el desarrollo de AR a los KIR2DL2, 2DL5a, 2DL5b, KIR2DS5 y 3DS1. La ausencia de KIR2DL5 en el haplotipo se asoció con un importante aumento del riesgo de AR (OddsRatio = 16.47), mientras que un haplotipo que contenga KIR2DL5 en ausencia de KIR2DL1 y KIR2DL3 confiere un efecto protector para el desarrollo de AR de hasta 14 veces en esa población (5). Otro estudio realizado en población caucásica del norte de Irlanda no encontró asociación entre KIR y AR (116).

La influencia de los genes HLA-C/KIR también se ha estudiado en referencia a la respuesta al tratamiento. En concreto, KIR2DS4 reduciría la tasa de respuesta a metotrexato en pacientes con AR (117). En otra publicación se estudió la influencia del binomio HLA-C/KIR en respuesta a fármacos anti-TNF α ; observaron que la positividad de KIR2DS2 se asociaba a peor respuesta y era aún peor en pacientes homocigotos respecto a los grupos alélicos de HLA-C (C1-C1 o C2-C2) (118).

5. CLÍNICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.

La AR es una enfermedad que se define clínicamente de forma típica en pacientes con tumefacción y dolor articular predominantemente simétrico en pequeñas articulaciones de manos y pies, junto con rigidez matutina y elevación de reactantes de fase aguda como la velocidad de sedimentación globular (VSG) o la proteína C reactiva (PCR). En la anamnesis dirigida el paciente puede referir síntomas generales como astenia, malestar general, pérdida de apetito o dolores difusos durante una temporada previa al comienzo de la inflamación articular; en algunos casos existe un traumatismo o un

proceso gripal o catarral que el paciente relaciona directamente con el inicio de la enfermedad (119).

Estas manifestaciones distan mucho de ser específicas de la AR por lo que es importante realizar un extenso diagnóstico diferencial que incluye la artritis reactiva, la etiología infecciosa bacteriana o viral y otras enfermedades del tejido conectivo (Tabla 5) que, aunque más raras, pueden presentarse de la misma manera (120).

Como se ha mencionado previamente no hay criterios diagnósticos en la AR; esto se debe a que existe una gran heterogeneidad en el curso clínico de los pacientes y resultan más adecuados los criterios de clasificación, que homogenizan una población con ciertas características comunes. De hecho, no es infrecuente no poder clasificar a los pacientes en el momento de la presentación de la enfermedad y es necesario esperar su evolución natural antes de afirmar categóricamente que el paciente padece una AR. En cualquier caso, con los criterios ACR 2010 es posible clasificar y por tanto tratar a la mayoría de los pacientes graves de forma precoz.

Además de las manifestaciones típicas de las que se puede inferir que la AR es una enfermedad articular, inflamatoria y sistémica, en la AR también aparecen manifestaciones extraarticulares y comorbilidades asociadas que contribuyen a la heterogeneidad clínica entre pacientes.

Tabla 5. CLÍNICA DISCRIMINATORIA EN PACIENTES CON POLIARTRITIS Y FIEBRE	
SINTOMA O SIGNO	DIAGNÓSTICOS POSIBLES
Fiebre > 40° C	Enfermedad de Still Artritis bacteriana Lupus eritematoso sistémico
Fiebre previa a la artritis	Artritis viral Enfermedad de Lyme Enfermedad de Still Endocarditis bacteriana
Artritis migratoria	Fiebre reumática Gonocemia Meningococemia Artritis viral Lupus eritematoso sistémico Leucemia aguda Enfermedad de Whipple
Derrame desproporcionado al dolor	Artritis tuberculosa Endocarditis bacteriana Enfermedad inflamatoria intestinal Arteritis de células gigantes Enfermedad de Lyme
Dolor desproporcionado al derrame	Fiebre reumática Fiebre mediterránea familiar Leucemia aguda Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Factor Reumatoide positivo	Artritis reumatoide Artritis viral Artritis tuberculosa Endocarditis bacteriana Lupus eritematoso sistémico Sarcoidosis Vasculitis sistémica
Rigidez matutina	Artritis reumatoide Polimialgia reumática Enfermedad de Still Algunas artritis virales y reactivas
Sinovitis simétrica pequeñas articulaciones	Artritis reumatoide Lupus eritematoso sistémico Artritis viral Artritis bacteriana
Leucocitosis (>15000/mm ³)	Endocarditis bacteriana Enfermedad de Still Vasculitis sistémica Leucemia aguda
Leucopenia	Lupus eritematoso sistémico Artritis viral
Recidivas episódicas	Enfermedad de Lyme Artritis inducida por cristales Enfermedad inflamatoria intestinal Enfermedad de Whipple Fiebre mediterránea Síndromes autoinflamatorios Enfermedad de Still Lupus eritematoso sistémico

Modificado de Pinals RS: Polyarthritits and fever. N Engl J Med 330:769. 1994.

5.1 MANIFESTACIONES ARTICULARES.

La AR es una enfermedad sistémica cuya repercusión fundamental se produce a nivel articular, con deformidades típicas que son producto de la destrucción cartilaginosa y erosión ósea. La presentación clínica es variable y se acompaña también de manifestaciones extraarticulares.

5.1.1. Formas de Presentación.

Los pacientes con AR se presentan habitualmente con un cuadro de afectación sistémica o articular de comienzo insidioso durante varias semanas, en el 55 al 65% de los pacientes (119). Típicamente se produce dolor y signos inflamatorios en varias articulaciones, localizado en muñecas, dedos de las manos (respetando articulaciones interfalángicas distales), pies y rodillas con tendencia a la afectación simétrica (121). Es raro que un grupo articular mejore mientras progresa en otra localización articular.

La presentación articular única (monoartritis) es relativamente frecuente y puede permanecer durante meses o años, típicamente en rodilla y más raramente en articulaciones de una sola extremidad o en grandes articulaciones proximales de forma asimétrica.

La afectación periarticular en forma de tenosinovitis o bursitis es otra posibilidad clínica al debut, con afectación predilecta de vainas tendinosas palmares en muñeca y dedos que puede persistir meses o años antes del desarrollo de una artritis franca.

Algunos pacientes presentan únicamente rigidez matutina mantenida durante algunos meses sin que se objetive inflamación clínica o por pruebas de imagen y también es posible que la única manifestación inicial esté relacionada con un atrapamiento del nervio mediano en probable relación con una tenosinovitis del retináculo flexor clínicamente silente.

En entre el 8 y el 15% de los pacientes el comienzo de la AR es agudo, alcanzando una expresión clínica completa en pocos días. Este inicio tan

brusco en ocasiones acompañado de fiebre obliga a un diagnóstico diferencial más extenso, sobre todo con sepsis o vasculitis.

Un 15-20% de los pacientes pueden tener un patrón de inicio intermedio, con desarrollo en pocas semanas.

La forma palindrómica es otra posibilidad de inicio; consiste en brotes de dolor, hinchazón y enrojecimiento de articulaciones y tejidos periarticulares de corta duración (desde horas a una semana), con periodos asintomáticos entre crisis. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con esta presentación terminan desarrollando una AR establecida, siendo más frecuente en aquellas pacientes mujeres con FR y/o ACPA positivos que presentan afectación de carpos o interfalángicas (122).

Una presentación particular pero característica es la denominada artritis robusta que ocurre en pacientes generalmente varones jóvenes trabajadores físicos y complexión atlética. Se presenta con gran tumefacción articular poco dolorosa o limitante y grandes nódulos subcutáneos (123).

Algunos pacientes pueden presentar alguna manifestación extraarticular como nódulos reumatoides, vasculitis, adenopatías periféricas o edema periarticular (124) como primera manifestación previa al desarrollo de la clínica articular.

La AR de inicio tardío (en mayores de 60 años) tiene algunas particularidades: ocurre en ambos sexos, tiene predilección por las articulaciones grandes de cinturas escapular y pelviana, un inicio más agudo y su clínica se superpone en ocasiones a la de la polimialgia reumática, siendo indistinguible en ocasiones (125).

En mayores de 70 años casi todas las AR debutan con el tipo RS3PE (acrónimo de: *remitting seronegative symmetrical sinovitis with pitting edema*), en la que hay una sinovitis simétrica que afecta carpos, MCF, IFP, hombros y la presencia de un marcado edema en manos y ocasionalmente en pies. Esta forma de presentación no es exclusiva de la AR y puede asociar una neoplasia oculta (126).

5.1.2. Curso clínico y complicaciones articulares.

La fase establecida de la AR la marca la presencia de tejido sinovial hipertrófico y la destrucción articular secundaria. La sinovitis se manifiesta con dolor, tumefacción y disminución de la movilidad. La tumefacción se produce por engrosamiento capsulo sinovial con edema y compresión por la presencia de líquido intraarticular, lo que limita el movimiento. La rigidez articular tras el reposo es típicamente mayor de 30 minutos, se debe a la redistribución del edema capsulo sinovial durante el reposo y mejora con la movilización. Existe cierta relación entre la función y la sinovitis, se ha observado que la AR no se desarrolla o es mucho más leve en miembros previamente paréticos (127). La sinovial reumatoide es destructiva y su presencia se asocia a daño en tejido circundante ya sea hueso, cartílago o tendón, lo que determina finalmente la disfunción, limitación y deformidades típicas de la enfermedad. Las complicaciones dependerán específicamente de la articulación o grupo articular afectado (128).

5.1.2.1. Columna cervical.

La columna cervical se afecta con frecuencia durante el curso de la enfermedad reumatoide, hasta en el 80% de los pacientes aunque no es habitual al inicio de la enfermedad (48). Puede aparecer degeneración osteocondral con inestabilidad secundaria y problemas neurológicos radicales o compresión medular, posiblemente por extensión desde las articulaciones de Luschka o interapofisarias que poseen tejido sinovial. La afectación radiológica de la articulación atlo-axoidea afecta hasta el 61% de los pacientes con AR evolucionada (129), con subluxación anterior o menos frecuentemente posterior o superior; los pacientes refieren dolor en occipucio y los síntomas neurológicos pueden llegar a ser graves en relación con fenómenos compresivos medulares o de las arterias vertebrales. Cuando aparecen síntomas mielopáticos cervicales suelen ser progresivos y aumentan la mortalidad de los pacientes (130).

5.1.2.2. Columna subcervical.

La afectación espinal subcervical es rara en la AR aunque pueden aparecer quistes sinoviales interapofisarios que compriman el espacio epidural o recesos laterales así como degeneración osteocondral o inestabilidad segmentaria (131).

5.1.2.3. Articulación temporo-mandibular.

La afectación clínica de la articulación temporo-mandibular (ATM) afecta a la mayoría de los pacientes con AR durante el curso de la enfermedad, y hasta el 90% de ellos tienen alteraciones estructurales en exploraciones radiológicas. (132,133). Pueden producirse fenómenos de maloclusión y artritis agudas que precisen infiltración.

5.1.2.4. Articulaciones cricoaritenoides.

En pacientes con AR se detectan anomalías laríngeas en más de la mitad de las autopsias, el 54% de las tomografías computerizadas (TC) y el 32% de las laringoscopias indirectas (134). La sinovitis cricoaritenoides puede provocar, además de dolor laríngeo, una inmovilización de las cuerdas vocales en aducción con estridor inspiratorio y en ocasiones también clínica derivada de la aspiración de contenido faríngeo.

5.1.2.5. Articulaciones esternoclaviculares y manubrio esternal.

Con frecuencia suelen estar afectadas ya que poseen tejido sinovial, aunque no suelen ser sintomáticas; en ocasiones se plantea diagnóstico diferencial con cuadros infecciosos superpuestos si la clínica es muy florida.

5.1.2.6. Hombro.

En el hombro se produce afectación de la sinovial glenohumeral, acromio-clavicular y bursas, con frecuentes lesiones en el manguito de los rotadores con frecuencia atribuible a una distensión y proliferación sinovial de la vaina del tendón largo del bíceps en troquíter humeral. El tejido sinovial proliferativo en bursa subdeltoidea puede explicar la resorción de tercio distal de clavícula observada en algunos pacientes.

5.1.2.7. Codo.

La afectación del codo en la AR es frecuente, aunque no suele producir intenso dolor ni disfunción, uno de los primeros signos de daño articular es la pérdida de la extensión completa. Afecta entre el 20 y el 65% de los casos.

4.1.2.8. Manos.

La muñeca es la articulación que se afecta con más frecuencia en la AR. En su historia natural la sinovitis va a debilitar el soporte ligamentoso de la articulación radio-cubital distal. El ligamento escafolunar también es propenso a la ruptura, produciendo una flexión del escafoides y una posición supinada de la mano con colapso de la columna radial de huesos carpales. La elongación relativa de cúbito distal favorece su luxación dorsal, erosión e impactación en carpo con anquilosis; el carpo tiende finalmente a alinearse con la superficie radial produciendo una desviación radial de metacarpos. La articulación puede subluxarse también en sentido anterior dificultando la flexión dorsal.

Quizás la deformidad más típica de la AR se produce en articulaciones metacarpofalángicas (MCF), con una subluxación palmar y la desviación en ráfaga cubital de todos los dedos. La desviación radial de metacarpos junto a la inestabilidad ligamentosa hace que la tensión tendinosa en flexión arrastre los dedos en sentido cubital. Esta deformidad limita la extensión de los dedos, dificulta el agarre fuerte y la ejecución de la pinza.

Las roturas tendinosas en la AR son relativamente frecuentes por dos motivos. Primero por roce sobre superficies óseas deformadas (ej: flexor propio del meñique sobre epífisis cubital), y segundo por invasión sinovial con destrucción tendinosa. Las rupturas tendinosas del aparato extensor se pueden corregir uniendo el trozo de tendón sano a otro no afectado con una función similar (transferencia). El Reumatólogo debe estar atento a estas rupturas tendinosas porque indican mal control de la enfermedad, pueden aparecer nuevas roturas; la reparación es más sencilla y tiene mayor probabilidad de éxito en fases iniciales. La incapacidad para extender los dedos puede deberse también a luxación del tendón extensor entre las cabezas de los metacarpianos pasando a tener una función flexora al estar por debajo de su eje. En caso de

luxación palmar de la articulación la extensión de dedos también será imposible. Otra situación poco frecuente que puede limitar la extensión de los dedos es la compresión del nervio interóseo posterior a nivel del codo.



FIGURA 13: Mano reumatoide clásica, nodular.

Las deformidades en los dedos son frecuentes; la deformidad en cuello de cisne es consecuencia de una hiperextensión de la articulación interfalángica proximal (IFP) con flexión de la interfalángica distal (IFD). Puede deberse a patología en MCF, IFP o IFD y el tratamiento debe ir dirigido a tratar la causa. Esta deformidad es limitante al incapacitar la flexión del dedo y cierre del puño.

La deformidad en boutonniere es más sencilla porque se origina siempre en la articulación IFP. Se produce una flexión del dedo con imposibilidad para extenderlo. Esto produce un defecto estético fundamentalmente y su reparación presenta el riesgo de producir una artrodesis en extensión que será menos funcional.

Las deformidades del pulgar se pueden clasificar también en deformidades en cuello de cisne (MCF extendida e interfalángica [IF] en flexión) y deformidades en boutonniere (MC en flexión y IF en hiperextensión) (135).

5.1.2.9. Cadera.

No es frecuente su afectación inicial pero casi la mitad de los pacientes con AR establecida presentan signos radiológicos de afectación de la cadera. Si la cabeza femoral colapsa y el acetábulo remodela ocurre una protrusión significativa en aproximadamente el 5% de los pacientes. Clínicamente se produce dolor inguinal y pérdida de rotación interna de la cadera afecta.

5.1.2.10 Rodillas.

La afectación de rodilla es muy frecuente en el curso de la AR. Típicamente se produce una atrofia cuadricepsal precoz y pérdida de la extensión completa, la rodilla adquiere una posición en semiflexión para acomodar el derrame articular. En ocasiones esta pérdida de extensión completa se hace fija y puede obligar a medidas correctoras. La excesiva presión del líquido sinovial con frecuencia se traduce en herniación sinovial poplíteo o quiste de Baker con el consiguiente dolor en hueco poplíteo con la extensión de la rodilla y posibles complicaciones como compresión venosa y edema distal. La rotura de un quiste de Baker produce un vertido de líquido sinovial inflamatorio en tejido intersticial con reacción inflamatoria distal muy similar al que se observa en una tromboflebitis aguda.

5.1.2.11. Tobillo y pie.

En la AR la mayoría de pacientes van a referir molestias en esta localización a lo largo de su historia natural(136). La afectación de tobillo no es frecuente al inicio ni en formas leves de AR. La articulación subastragalina, sin embargo, se afecta con mayor frecuencia y dificulta a los pacientes para caminar por superficies irregulares. La afectación del pie en la AR es predominantemente distal, afectando con frecuencia articulaciones metatarsofalángicas (MTF) e IFP. Los ligamentos intermetatarsianos se distienden ensanchando el antepie y se produce una migración anterior del tejido fibroadiposo, subluxación dorsal de los dedos con acortamiento de los tendones flexores y exposición de las cabezas de los metacarpianos a la región plantar subcutánea de presión. El dedo gordo se deforma en valgo y comprime al segundo y tercer dedo. En este contexto se puede producir un hallux rigidus

con anquilosis de la interfalángica del primer dedo que puede ser muy dolorosa. También hay que considerar la existencia de un túnel tarsiano en el diagnóstico diferencial del pie reumatoide doloroso (137).

5.2 MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES.

Las manifestaciones extraarticulares en la AR son consecuencia del proceso inflamatorio sistémico o de reacciones inmunológicas localizadas en órganos concretos. Es importante recordar que su frecuencia varía a lo largo de la evolución de la enfermedad y se asocian con una mayor mortalidad (138).

Así, al debut de la enfermedad es más frecuente encontrar linfadenopatías, esplenomegalia, pleuro-pericarditis o una compresión del nervio mediano; son manifestaciones tardías la osteoporosis, la amiloidosis renal o el síndrome seco establecido (139).

5.2.1. Manifestaciones sistémicas.

La fatiga es muy frecuente en la AR y se relaciona con el nivel de actividad y extensión de la artritis. Puede haber febrícula, anorexia y pérdida de peso; la debilidad y atrofia muscular generalizada aparece en casos de larga evolución y con mal control de la enfermedad.

5.2.2. Manifestaciones cutáneas.

El hallazgo más característico y frecuente (entre el 20 y el 30% de los pacientes) es el nódulo reumatoide; se define como una formación subcutánea redondeada, firme y habitualmente indolora de entre 0.5 y 3 cm y que histológicamente presenta una zona central necrótica fibrinoide, una zona intermedia con histiocitos en empalizada y una externa mal delimitada con gran infiltración fibrovascular y de células redondas (140); habitualmente aparecen en superficie extensora articular o zonas de presión. El eritema palmar y el adelgazamiento cutáneo periarticular también son frecuentes, además de trastornos locales como callosidades por hiperpresión que pueden ulcerarse e infectarse. La AR está considerada una causa de Raynaud secundario, ocurre

en aproximadamente el 10% de los pacientes (141). Otras manifestaciones son la xerosis en el marco de un Sd. Sjögren secundario y menos frecuentemente dermatosis neutrofílicas como el Sd. de Sweet o el pioderma gangrenoso.

5.3.3. Manifestaciones oftalmológicas.

La manifestación más frecuente es el síndrome seco, como parte de un síndrome de Sjögren secundario. La escleritis y epiescleritis ocurren en menos del 1% de los pacientes, pero son particularmente graves cuando aparecen, al asociarse a perforación ocular si no se tratan de forma intensa. La vasculitis retiniana también se ha descrito, aunque es muy poco frecuente.

5.3.4. Vasculitis.

La vasculitis reumatoide afecta fundamentalmente a vasos pequeños y se manifiesta de forma variable como infartos periungueales, úlceras cutáneas, exantema cutáneo, gangrena, púrpura palpable, neuropatía sensitivo motora, síntomas sistémicos o arteritis de órgano interno. La vasculitis sistémica es rara y la vasculitis necrotizante se asocia a un aumento significativo de mortalidad (142), aunque su incidencia haya disminuido en los últimos años (143).

5.3.5. Manifestaciones Óseas.

Los pacientes con AR tienen un riesgo aumentado de fractura atribuible al uso de glucocorticoides (144), con una disminución difusa de masa ósea de forma temprana atribuible a la actividad inflamatoria (145). Esta pérdida difusa de masa ósea se asocia con una alta incidencia de fractura de huesos largos en la AR, en particular del peroné. La presencia de erosiones puede predisponer también a la fractura de los huesos afectados por estrés, generalmente metatarsianos o falanges de los pies.

5.3.6. Manifestaciones musculares.

La debilidad muscular es común en la AR, en parte por desuso pero también se han descrito distintos tipos de miositis asociadas a la AR: una atrofia de fibras de tipo II, una neuromiopatía periférica asociada a mononeuritis múltiple, una miopatía esteroidea, miositis activa con necrosis muscular y focos

de infiltrado mononuclear en endomisio y una miopatía crónica parecida a un proceso distrófico en fases avanzadas (146).

5.3.7. Infección y cáncer.

Los pacientes con AR tienen un riesgo ligeramente aumentado de infecciones cuando son de edad avanzada, con manifestaciones extraarticulares de AR, leucopénicos y aquellos con comorbilidades como neumopatía crónica, alcoholismo, diabetes mellitus y aquellos que usan glucocorticoides (147).

Los pacientes con AR tienen un riesgo entre dos y tres veces superior a la población normal de desarrollar una enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y leucemia, independientemente del tratamiento inmunosupresor. También hay un ligero aumento del riesgo para cáncer de pulmón y una disminución del riesgo para padecer cáncer colorectal y de mama (148).

5.3.8. Trastornos hematológicos.

La mayoría de los pacientes con AR tiene una anemia normocítica e hipocroma en relación con la actividad de la enfermedad por lo que mejora con el control de la enfermedad, aunque algunos precisarán ferrotterapia. La aplasia de la serie roja es rara en la AR. La presencia de eosinofilia y trombocitosis se relacionan también con una mayor actividad inflamatoria.

Un subgrupo de pacientes con AR tiene un aumento del número de linfocitos granulares grandes en sangre periférica, médula ósea e hígado que pueden llegar a suponer el 90% de los neutrófilos de sangre periférica (leucemia de linfocitos granulares grandes). Frecuentemente esta observación se acompaña de un recuento bajo de neutrófilos y esplenomegalia, lo que definiría al síndrome de Felty, una manifestación extraarticular clásica y rara de la AR. Ambas entidades están asociadas a la presencia de HLA-DR4 y se piensa que conforman variantes de un mismo síndrome (149).

La aparición de una para-proteína por gammapatía monoclonal es de mal pronóstico en pacientes con AR porque conlleva una alta frecuencia de transformación maligna a linfoma o mieloma (150).

5.3.9. Manifestaciones renales.

Los pacientes con AR tienen con frecuencia disfunción renal sobre todo en relación con la enfermedad cardiovascular (151). El tratamiento con sales de oro, D-penicilamina se asocian a nefropatía membranosa. La amiloidosis es una complicación rara y tardía, sobre todo asociada a la enfermedad de Still del adulto.

5.3.10. Manifestaciones pulmonares.

La afectación pulmonar en la AR es importante ya que en ocasiones está presente desde el debut y es responsable de entre el 10 y el 20% de la mortalidad en estos pacientes.

Al menos existen seis formas de afectación pulmonar en la AR; la pleuritis es un hallazgo frecuente en biopsias y afecta aproximadamente al 20% de los pacientes al debut, aunque el dolor pleurítico no suele ser muy importante. El líquido pleural es exudativo con baja concentración de glucosa y en ocasiones puede complicarse con neumotórax o empiema.

El intersticio pulmonar puede afectarse y la enfermedad intersticial pulmonar es responsable de la mayoría de la mortalidad; los patrones más frecuentemente observados son la neumonía intersticial usual y la neumonía intersticial no específica. Tienen más riesgo de desarrollarla pacientes fumadores de edad avanzada, con FR a títulos altos o ACPA positivo, historia familiar de AR y sexo masculino en algunos estudios.

La afectación de la vía aérea es frecuente, ocurre entre el 39 y 60% de los pacientes, las más frecuentes son las bronquiectasias, bronquiolitis, hiperreactividad bronquial y la ya mencionada artritis cricoaritenoides.

La enfermedad nodular pulmonar acontece cuando aparecen nódulos reumatoides en parénquima pulmonar. Pueden aparecer de forma aislada o en grupos coalescentes. En pacientes con AR y neumoconiosis puede ocurrir una violenta reacción fibrótica granulomatosa obliterante denominada síndrome de Caplan.

La hipertensión arterial pulmonar es rara en la AR y aunque puede aparecer arteritis o venulitis en casos de vasculitis, el pulmón no se afecta con frecuencia por este motivo (152).

5.3.11. Manifestaciones cardíacas.

La afectación pericárdica es frecuente en la AR, aunque rara vez se diagnostica, está presente en aproximadamente un tercio de los pacientes; sobre todo en pacientes con FR positivo y enfermedad nodular.

La afectación valvular también es frecuente, sobre todo calcificaciones y nódulos en válvulas aórtica y mitral (153).

La afectación granulomatosa del parénquima miocárdico y arterias cardíacas pueden producir miocarditis, defectos de conducción, aortitis o arteritis coronaria.

Estos cambios junto a un mayor índice aterogénico observado en pacientes con AR activa, hipertensión arterial (más frecuente en pacientes con AR), resistencia insulínica, tabaco y un bajo índice de masa ósea justifican el aumento de riesgo cardiovascular observado en pacientes con AR (154).

TABLA 6. MANIFESTACIONES EXTRAARTICULARES EN ARTRITIS REUMATOIDE

ÓRGANO AFECTO	MANIFESTACIÓN EXTRAARTICULAR
Manifestaciones generales	Fatiga, febrícula, anorexia, pérdida de peso, debilidad, atrofia muscular generalizada.
Piel	Nódulos reumatoides, fenómeno Raynaud, eritema palmar, petequias, púrpura, úlceras, gangrena, xerosis, dermatosis neutrofílica.
Ojo	Queratoconjuntivitis seca, escleritis, epiescleritis.
Musculoesquelético	Osteoporosis/fragilidad ósea, rotura tendinosa y ligamentosa, debilidad muscular periarticular, miopatía.
Hematopoyesis	Anemia normocítica, eosinofilia, trombocitosis, linfocitos granulares grandes/síndrome de Felty (esplenomegalia, neutropenia).
Riñón	Amiloidosis. Nefropatía membranosa iatrógena. Vasculitis renal.
Pleuropulmonar	Bronquiolitis obliterante, nodulosis pulmonar, neumonía intersticial usual, neumonía intersticial no específica, pleuritis, empiema, neumotórax.
Cardiovascular	Vasculitis, arterioesclerosis, pericarditis, valvulopatía aórtica y mitral, granulomatosis miocárdica y vascular, arritmias.

6. MEDIDAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.

No existe una manera única de medir cuantitativamente el estado clínico de los pacientes con AR, sino que se han venido utilizando diversas herramientas tanto en clínica como en investigación; valores de laboratorio, índices radiológicos, recuentos articulares, capacidad funcional, medidas globales y cuestionarios administrados al paciente. Estas herramientas pueden medir actividad clínica, daño articular, discapacidad a largo plazo o combinaciones de los anteriores. Algunas medidas como el dolor o la tumefacción articular pueden mejorar con el tiempo y son adecuadas para valorar respuesta a tratamiento a corto plazo en ensayos clínicos, mientras que los índices radiológicos muestran cambios irreversibles y pueden ser útiles en estudios prospectivos para valorar variaciones a medio o largo plazo en la progresión de la enfermedad(155). (Tabla 7).

TABLA 7. MEDIDAS EN ARTRITIS REUMATOIDE

Actividad	Recuento articular (tumefacción y dolor), reactantes de fase aguda, datos de resonancia magnética y ecografía (sinovitis, derrame, edema,...)
Actividad ± daño	Recuento articular (dolor y limitación al movimiento), HAQ y cuestionarios derivados, escalas de dolor, valoración del médico, valoración del paciente, clase funcional, manifestaciones extraarticulares, comorbilidades.
Daño	Deformidad articular, índices radiológicos (erosiones y pinzamiento articular).
Desenlace	Cirugía articular, prótesis, discapacidad funcional, discapacidad laboral, muerte prematura, coste por paciente.
HAQ: <i>Health Assessment Questionnaire</i> .	

Una medida de actividad y daño utilizada ampliamente en ensayos clínicos es el *ACR core data set*, que incluye el recuento de articulaciones inflamadas, dolorosas, valoración del médico, VSG o PCR, estado funcional, dolor y valoración del paciente de su estado global, en función de la magnitud de cambio, se clasifican en respuesta ACR 20, 50, 70 y 90. En ensayos de un año de duración o más se añade el daño radiográfico. (156). En práctica clínica el más utilizado es de *disease activity score* (DAS) que prescinde de la valoración del médico, estado funcional y dolor; resulta más rápido y práctico de utilizar en consulta y también se utiliza en ensayos clínicos, el más utilizado es el que hace recuento articular en 28 articulaciones, o DAS28 (157). Otros índices de uso común son el *simplified disease activity index* (SDAI) y el *clinical disease activity index* (CDAI), que junto al índice de Boolean se utilizan para definir remisión (158). Ver tabla 8.

TABLA 8. INDICES COMPUESTOS CON RECuento ARTICULAR Y CORRELACION CON ACTIVIDAD DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

INDICE	COMPONENTES	PUNTOS DE CORTE			
		REMISION	BAJA ACTIVIDAD	MODERADA ACTIVIDAD	ALTA ACTIVIDAD
DAS 28 (VSG o PCR)	Nº articulaciones dolorosas (0-28) Nº articulaciones inflamadas (0-28) VSG (mm/h) o PCR(mg/dL) Valoración global paciente	<2,6	2,6-3,2	3,2-5,1	>5,1
SDAI	Nº articulaciones dolorosas (0-28) Nº articulaciones inflamadas (0-28) Valoración global paciente Valoración médico PCR (mg/dL)	<3,3	3,3-11	11-26	>26
CDAI	Nº articulaciones dolorosas (0-28) Nº articulaciones inflamadas (0-28) Valoración global paciente Valoración médico	<2,8	2,8-10	10-22	>22
REMISION ACR-EULAR	SDAI CDAI Indice Boolean: Nº articulaciones dolorosas (0-28), Nº articulaciones inflamadas (0-28), valoración global paciente, PCR(mg/dL)	SDAI <3,3 CDAI <3,3 Boolean: todos 0 o 1.			

DAS 28: Disease activity Index (28 articulaciones), VSG: Velocidad de sedimentación globular. PCR: Proteína C Reactiva, SDAI: Simplified disease activity index. CDAIS: Clinical disease activity index.

El daño radiológico en la AR se relaciona con la discapacidad y existe un gran interés en objetivar ese daño y su evolución en el tiempo para su uso en ensayos clínicos e investigación. Se han desarrollado métodos de lectura estandarizados para tal fin. Inicialmente se utilizaba el score global de Steinbroker (159) pero no era lo suficientemente preciso para detectar cambios en el tiempo. Los dos métodos más ampliamente utilizados son el de Sharp que puntúa de forma separada las erosiones y el pinzamiento del espacio articular; y el de Larsen, que puntúa cada articulación por separado (160). Posteriormente han ido surgiendo modificaciones sucesivas con el fin de simplificar la lectura radiográfica(161). Los aspectos fundamentales de la evaluación radiológica son las erosiones y el pinzamiento del espacio articular; éste último correlaciona mejor con la discapacidad funcional de los pacientes. En el año 2003 se describió un método de evaluación por resonancia magnética de los pacientes que incluye valoración de sinovitis y tejidos periarticulares (162) y existen secuencias de resonancia específicas para valorar el daño en cartílago y el grado de pinzamiento para uso en investigación. También disponemos de la ecografía para valorar la AR, podemos observar la sinovial, el contenido articular, las vainas tendinosas y la superficie ósea por lo que podríamos valorar tanto actividad (derrame, sinovial,

edema) como el daño (erosiones). En los últimos años se han desarrollado scores radiológicos de actividad mediante ecografía (163).

La discapacidad se refiere al estado funcional del paciente para realizar tareas cotidianas y se mide de forma universal mediante el *Health Assessment Questionnaire-Disability Index* (HAQ), un cuestionario autoaplicado de 20 preguntas sobre capacidad funcional en ocho áreas diferentes con puntuación de 0 a 3 en función de las dificultades para realizarlas, junto con una escala análoga visual (VAS) para valorar el dolor y una valoración de la situación global; este cuestionario se puede completar en 5 minutos (164). El HAQ modificado (MHAQ) se desarrolló para simplificar el sistema de puntuación (165) y el HAQ multidimensional (MDHAQ) se desarrolló incluyendo seis preguntas más para detectar dificultades en la vida diaria, valoración de la fatiga, minutos de rigidez matutina y cambios en el estado general con la ventaja de ser rápido de puntuar. El HAQ clínico (CLINHAQ) tiene 4 páginas e incluye las preguntas del HAQ, escalas de ansiedad y depresión, un diagrama de dolor, escala de fatiga y otras escalas y se ha utilizado ampliamente en investigación. Otro índice ampliamente utilizado es el *Arthritis Impact Measurement Scales* (AIMS) aunque no es tan fácil de autocumplimentar como el HAQ. El cuestionario *Short Form 36* (SF36) es un cuestionario genérico no específico de la AR que permite hacer comparaciones con otras enfermedades en el contexto de la investigación clínica (155).

El cuestionario *Routine Assessment of Patient Index Data 3* (RAPID3) (166) incluye los datos del HAQ, la percepción de dolor y la valoración global de la enfermedad por parte del paciente, lo que lo convierte en una buena herramienta para el control del paciente tanto en la práctica clínica como en investigación, con la ventaja de que ofrece un índice muy rápido de calcular y correlaciona bien con otros índices de actividad como el *Disease Activity Index 28* (DAS 28) y el *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) (167,168), sin necesidad de realizar recuentos articulares por parte del médico. En función de los resultados de estos cuestionarios se puede estratificar a los pacientes por gravedad.

7. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.

El objetivo fundamental del tratamiento de la AR es frenar la inflamación, como motor del daño articular, extraarticular, discapacidad y aumento de mortalidad.

Ya se han discutido previamente los aspectos históricos respecto al tratamiento, actualmente el concepto que mejor define la actitud terapéutica sería el conocido como *“treat to target”* o, en castellano, *“tratar hasta conseguir el objetivo”* (169). Esta estrategia ha tenido gran calado en la reumatología porque expresa de forma clara la filosofía del tratamiento, independientemente del arsenal farmacológico de que disponga el reumatólogo. Utilizando los fármacos disponibles, perseguir un objetivo de remisión de manera precoz en la AR siempre será beneficioso para el paciente. De hecho, aquellos pacientes que consiguen el objetivo de remisión al 80% en 3 meses tienen más posibilidades de conseguir el objetivo completo a los 6 meses (170). En aquellos pacientes que no consiguen el objetivo se recomienda intensificar o replantear el tratamiento, siempre teniendo en cuenta los factores intrínsecos del paciente y los riesgos de la medicación.

Otro hecho interesante es la evidencia de que los pacientes controlados de manera precoz al inicio de la enfermedad van a presentar una mejor evolución clínica y funcional que aquellos que son tratados con una enfermedad ya establecida, con mayor probabilidad de remisión sostenida sin medicación; es lo que ha venido a denominarse *“ventana de oportunidad”* en el tratamiento de la AR (171).

El objetivo del tratamiento es que el paciente entre en baja actividad de la enfermedad o remisión, que se define en función de la puntuación de los índices de actividad que se han discutido previamente.

Los fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) en la artritis reumatoide son fármacos que actúan sobre la inflamación y deben ser capaces por definición de modificar la progresión y daño estructural de la enfermedad.

Los antiinflamatorios no esteroideos no se consideran FAME porque, aunque reducen el dolor y la rigidez articular, no modifican la historia natural de la AR.

Los glucocorticoides producen una mejoría franca y rápida de los síntomas y aunque su uso se asocia a múltiples efectos adversos a largo plazo, podría considerarse que dosis bajas de corticoide de forma crónica son útiles y se podrían considerar un FAME (172).

Existen fundamentalmente dos tipos de FAME (Tabla 9), los sintéticos (FAMEs) y los biológicos (FAMEb). La diferencia entre ellos estriba en el método de fabricación y la estructura molecular. Mientras los FAMEs son compuestos químicos pequeños de síntesis en laboratorio, los biológicos son estructuras proteicas grandes (mayormente constructos de inmunoglobulinas) que precisan del uso de organismos biológicos para su producción.

7.1 FÁRMACOS ANTIREUMÁTICOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD SINTÉTICOS.

Dentro de los FAMEs (Tabla 9) podríamos diferenciar los convencionales (FAMEsc), cuyo mecanismo de actuación no se conoce completamente, y los dirigidos (FAMEsd) que van a bloquear señales concretas de transmisión intracelular de la inflamación (inhibidores de la Jannus Kinasa). El FAMEsc por excelencia y el más ampliamente utilizado es el metotrexato por su buen perfil de eficacia, seguridad, efectos secundarios y su sinergia en combinación con FAMEb. Otros FAMEs son la sulfasalazina, leflunomida y antimaláricos (hidroxicloroquina, cloroquina). La combinación de varios FAMEs clásicos puede ser eficaz y una opción en determinados pacientes con AR establecida, aunque actualmente no se contempla en las recomendaciones ACR de 2015 para el tratamiento de la AR de inicio (173).

Los FAMEsd actúan bloqueando jannus kinasa (JAK), una enzima clave en la amplificación de la señal inflamatoria a nivel intracelular (tofacitinib, baricitinib, upadacitinib, filgotinib...); actualmente tienen indicación en pacientes

con respuesta inadecuada a metotrexato y presentan eficacia y precio similar a los FAMEb.

TABLA 9. FARMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD (FAME) EN ARTRITIS REUMATOIDE

FARMACO	MOLECULA	DOSIS	OBSERVACIONES
FAME sintéticos convencionales			
Metotrexato	Sintética pequeña	25 mg semanales	Iniciar 10 mg semanales y escalada de dosis en 4-8 semanas. Importante suplementos de ácido fólico.
Leflunomida	Sintética pequeña	20 mg diarios	Dosis de carga opcional, se asocia a más efectos adversos gastrointestinales.
Sulfasalazina	Sintética pequeña	3 gramos diarios	Iniciar 1 g diario y subir en 4-8 semanas.
Hidroxicloroquina	Sintética pequeña	400 mg diarios	En artritis leve o en combinación.
FAME sintéticos dirigidos			
Tofacitinib	Sintética pequeña	5 mg cada 12 h.	Inhibición JAK 1, 3.
Baricitinib	Sintética pequeña	2 o 4 mg diarios	Inhibición JAK 1, 2.
FAME biológicos			
Anti TNFα*			
Etanercept	Proteína fusión	50 mg semanales	Subcutáneo. Biosimilar disponible.
Infliximab	Anticuerpo quimérico	3 mg/Kg cada 8 semanas.	Intravenoso. Inicio semanas 0, 2, 6. Biosimilar disponible.
Adalimumab	Anticuerpo humano recombinante	40 mg/14 días	Subcutáneo. Biosimilar disponible.
Golimumab	Anticuerpo humano	50 mg al mes	Subcutáneo.
Certolizumab	Fragmento anticuerpo humanizado	200 mg cada 14 días	Subcutáneo. Se puede utilizar durante el embarazo.
Anti célula B			
Rituximab	Anticuerpo quimérico	1 g cada 6 meses	Intravenoso. Biosimilar disponible.
Inhibidores co-estimulación de célula T			
Abatacept	Proteína de fusión	125 mg semanales	Subcutáneo, disponible intravenoso.
Anti Interleucina 6			
Tocilizumab	Anticuerpo humanizado	162 mg semanales.	Subcutáneo, disponible intravenoso.
*TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.			

7.2 FAME BIOLÓGICOS.

Dentro de los FAMEb existen fármacos con cuatro mecanismos de acción fundamentalmente: bloqueo del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), inhibición del receptor de IL-6, bloqueo de la co-estimulación de la célula T y depleción de linfocitos B. Algunos pacientes responden a bloqueo de la vía de

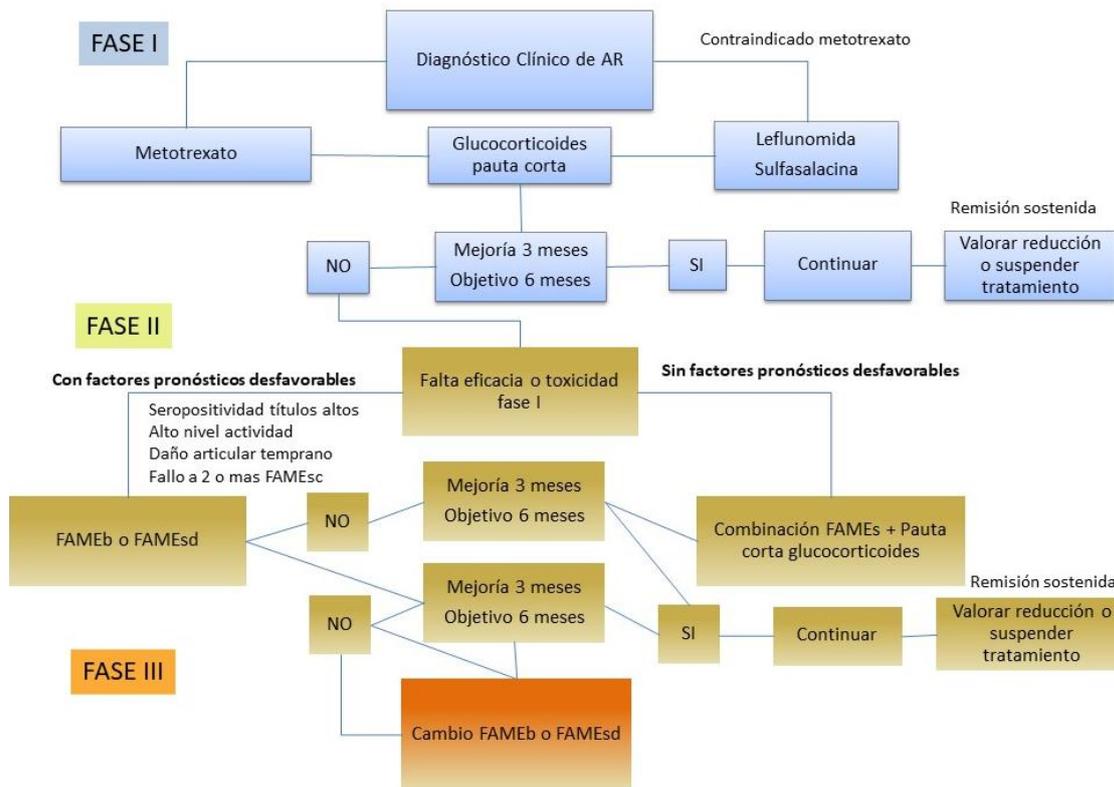
la IL-1. Como regla general todos los FAMEb tienen una eficacia similar, consiguiendo respuestas ACR 70 superiores en pacientes no tratados previamente y pierden eficacia en pacientes multitratados (174). No hay duda de que han supuesto una revolución en el tratamiento de los pacientes que no responden de forma completa a FAMEsc.

7.3 RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.

En sus guías terapéuticas, tanto ACR como EULAR recomiendan en pacientes con AR de reciente diagnóstico iniciar el tratamiento con un FAMEs (metotrexato de preferencia), añadiendo pauta corta de glucocorticoides en pacientes con actividad moderada o alta. Se recomienda escalada rápida de FAMEs hasta su dosis máxima (25 mg por vía subcutánea en caso de metotrexato). El objetivo es una mejoría importante (entre 50 y 80%) en los 3 primeros meses y remisión o baja actividad a los 6 meses. Si no se consigue se recomienda pasar a una combinación de FAMEsc (en pacientes sin factores de gravedad: seropositividad a títulos altos, daño articular precoz, actividad de la enfermedad alta o fallo a 2 o más FAMEsc) o añadir cualquier FAMEb o FAMEsd al tratamiento y posteriormente si no es efectivo se cambia por otra molécula FAMEb o FAMEsd de forma indefinida o hasta obtener respuesta. Cuando un FAMEb falla (fallo primario) o pierde eficacia (fallo secundario) el cambio de agente biológico es una estrategia que con frecuencia es exitosa, incluso entre FAMEb con el mismo mecanismo de acción como los anti TNF α .

En caso de obtener la remisión mantenida se recomienda valorar reducción de dosis o espaciamiento en la administración y eventualmente suspender el tratamiento, sabiendo que el riesgo de recaída es elevado; el riesgo de recaída es menor en pacientes con remisión mantenida durante más tiempo. En cualquier caso la mayoría de pacientes que broten responderán al reintroducir el tratamiento (175).

FIGURA 14: RECOMENDACIONES EULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE



Adaptada de EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. Smolen JS et al. Annals of the Rheumatic Diseases, 76 (6). pp. 960-977.

7.4 ARTRITIS REUMATOIDE REFRACTARIA

Una proporción de pacientes no responden al tratamiento. En la era previa al tratamiento biológico las opciones de tratamiento eran limitadas al uso de FAME sintéticos en monoterapia o combinados y corticoesteroides. Con la aparición de los tratamientos biológicos las distintas sociedades implantaron unos criterios para definir refractariedad al tratamiento, basadas en el DAS28 y en la historia previa de exposición a FAME (Figura 5) (176). Con la introducción de los FAME biológicos y extrapolando los datos de ensayos clínicos, aproximadamente el 40% de los pacientes van a fallar a un primer biológico(177) y otro 40% a un segundo (178–180), lo que implica que al menos un 20% de los pacientes con AR necesitarán un tercer biológico para intentar controlar la enfermedad, con un 6% de pacientes que tampoco responderán adecuadamente según el registro inglés (181). Los ensayos

clínicos que han estudiado la respuesta inadecuada a un primer anti-TNF α (178–180), muestran con carácter general una tasa de respuesta ACR 20, 50 y 70 del 50%, 30% y 20% respectivamente, por lo que podríamos decir que la mayoría de los pacientes (hasta el 70%) que precisan un segundo biológico no experimentan un cambio clínico realmente importante.

Las causas de la refractariedad de la AR al tratamiento no son del todo conocidas, pero se asume que la causa debe ser multifactorial; por un lado tendríamos factores relacionados con la enfermedad, heterogénea desde muchos puntos de vista, por lo que posiblemente la diana terapéutica no sea la misma en todos los pacientes; podría haber un predominio de la inmunidad innata frente a la adaptativa (p. ej. en pacientes seronegativos), podrían estar implicados mecanismos autoinflamatorios y/o autoinmunes en el mismo paciente, o ser más dependiente de la respuesta estromal.

Otra posibilidad es que se explique por fenómenos farmacocinéticos, como ocurre con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra el fármaco biológico, que aceleran el aclaramiento de fármaco reduciendo drásticamente sus niveles. Su aparición favorece el desarrollo de anticuerpos antifármaco contra subsecuentes tratamientos biológicos. Esto ocurre de manera clara en el caso de tratamientos biológicos con fragmentos murinos (infliximab, adalimumab y rituximab), pero puede ser clínicamente relevante.

Por último, se debe considerar a los falsos positivos, pacientes con otros factores biomecánicos como dolor, coexistencia de enfermedad degenerativa o cuadros de sensibilización central al dolor (182).

8.-JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.

La presente tesis pretende estudiar la influencia de determinantes inmunogenómicos en la patogenia de la AR, con especial interés en el binomio HLA-C/KIR. Existen algunas evidencias de su implicación en la patogenia sobre todo de la vasculitis reumatoide, pero su efecto no ha sido aún estudiado en pacientes del área geográfica de Murcia, en el sureste español. Para ello se

hará genotipado HLA de clase I y KIR en pacientes con AR de nuestro entorno, comparándolos con una población similar de pacientes sanos en primer lugar y también se estudiará si esta interacción se asocia a alguna de las características clínicas, analíticas o de tratamiento de los pacientes incluidos en el estudio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. HIPÓTESIS.

La Artritis Reumatoide es una enfermedad de causa autoinmune con consecuencias serias para los pacientes, en la que los mecanismos subyacentes no son del todo conocidos. La célula NK y en concreto el binomio HLA/KIR tiene interés potencial en la patogenia de la AR ya que podría explicar el desarrollo de mecanismos inmunes adaptativos en una población con Artritis Reumatoide del sureste español. Respecto al HLA-C se estudiará la relación con el dimorfismo del CMH en las posiciones 77 y 80 de la cadena $\alpha 1$ del HLA de clase I. En los genes KIR se valorará la frecuencia de los diferentes receptores y haplotipos individualmente y su relación con el HLA-C y el resto de HLA de clase I que interaccionan con KIR.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivos primarios:

1. Describir las características clínicas de una cohorte de pacientes con diagnóstico de AR respecto a variables, clínicas, analíticas, de actividad, calidad de vida y tratamiento. Describir una cohorte de sujetos sanos como población control y estudiar su comparabilidad en edad y sexo respecto a la población de enfermos de AR.
2. Analizar las diferencias en las frecuencias alélicas del HLA clásicos de clase I (A, B y C) entre la población de pacientes con AR frente una población control.
3. Analizar las diferencias de frecuencias alélicas de ligandos KIR en pacientes con AR y controles: en HLA-C en función de su dimorfismo en las posiciones 77 y 80 de la cadena alfa1 (C1, C2); en HLA-A y HLA-B

en función del dimorfismo en posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (Bw4, Bw6).

4. Analizar las frecuencias alélicas de genes y haplotipos KIR de población enferma en comparación con la población control.
5. Estudiar las combinaciones HLA/KIR en los pacientes con AR y compararlas con las de la población control.

2.2 Objetivos secundarios:

6. Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) en la población de pacientes con AR respecto a la presencia o ausencia de variables cualitativas clínicas previamente definidas.
7. Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) en la población de pacientes con AR respecto a variables cualitativas de laboratorio previamente definidas.
8. Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) en pacientes con AR respecto a variables cualitativas de tratamiento definidas.
9. Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) que hubieran resultado estadísticamente asociadas en el estudio caso-control respecto a variables cuantitativas analíticas definidas.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

En el presente trabajo se realiza un estudio de cohorte de pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide (AR), pertenecientes al servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y un grupo de individuos sanos.

Para su inclusión en el estudio fue imprescindible la firma de consentimiento informado. El estudio, consentimiento informado y hoja de recogida de datos fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (ver anexo I).

2. DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE.

Para su inclusión en el estudio los pacientes debían presentar un diagnóstico de AR por su reumatólogo, en base a los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 y/o de 2010.

3. PACIENTES Y CONTROLES.

En el presente estudio se han incluido 151 pacientes con AR pertenecientes al servicio de reumatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Al mismo tiempo se han estudiado 150 voluntarios sanos de similar edad al diagnóstico, sexo, etnia y área geográfica que los pacientes. Se aplicaron los mismos criterios de exclusión para pacientes y controles, descartando los controles con antecedentes familiares de AR.

3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.

Los pacientes se seleccionaron sobre la base de los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Diagnóstico de Artritis Reumatoide.
- Firma del consentimiento informado.
- Edad mayor de 18 años.
- Aceptación de la obtención de muestras.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Paciente que no cumple los criterios de inclusión.
- Pacientes sin información clínica suficiente en historia clínica.
- Pacientes en los que no se pueda hacer una anamnesis y exploración física completa.

Los pacientes fueron seleccionados mediante entrevista personal realizada por el doctorando en el momento de su visita clínica rutinaria o en la sala de extracciones en el momento de su analítica de rutina.

En la visita inicial, el doctorando realizó la selección de los pacientes, revisando la historia clínica y las exploraciones complementarias necesarias para la confirmación del diagnóstico de AR. Tras confirmar el diagnóstico, se solicitó el consentimiento al paciente para su inclusión en el estudio y la obtención de muestras biológicas.

3.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CONTROLES SANOS.

Los pacientes se seleccionaron en base a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Individuos sanos.
- Firma del consentimiento informado.
- Edad mayor de 18 años.
- Aceptación de la obtención de muestras biológicas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Individuos que no cumplen los criterios de inclusión.
- Individuos con enfermedades concomitantes como enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, inmunodeficiencias u otras patologías que puedan interferir en el estudio.
- Familiar de primer grado del individuo con AR: Padres, hijos y hermanos.
- Familiar de segundo grado del individuo con AR: tíos, primos y abuelos.

La evaluación de la no concomitancia de enfermedades por inmunodeficiencias u otras enfermedades de base inmunológicas fue evaluada por médicos del Servicio de Inmunología del HCUVA.

4. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

El procedimiento de recolección de muestras se realizó en pacientes consecutivos que acudían a hospital de día para infusión intravenosa de medicamento biológico ó para visita clínica con analítica programada.

4.1 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS; OBTENCIÓN Y ALMACENAJE ADN.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción venosa de pacientes e individuos sanos, y fueron recogidas en tubos anticoagulados con

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en el momento de la visita. A los pacientes se les extrajo además un tubo seco para centrifugación y obtención de suero para su reserva.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit QIAamp DNA Blood Midi (QUIAGEN, Hilden, Alemania, según instrucciones del fabricante. El ADN extraído se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) que se guardaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Para evitar contaminaciones de las muestras de ADN se habilitaron dos localizaciones, una dedicada a las manipulaciones pre-reacción en cadena de la polimerasa o pre-PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) y otra para la manipulación de los fragmentos amplificados (post-PCR). Además, siempre se utilizaron guantes desechables y material estéril para su procesamiento.

4.2 PROCEDIMIENTO PCR-SSO.

El procedimiento de tipificación de PCR-SSO (del inglés, *Sequence Specific Oligonucleotide*) se basa en la identificación de secuencias concretas del ADN amplificado por PCR, mediante su hibridación con sondas complementarias sintetizadas con ese propósito (SSO). El ADN amplificado se expone a sondas que pueden estar o no presentes y a sondas control que son homólogas a secuencias siempre presentes en los alelos de un locus.

4.2.1 Amplificación por PCR.

La amplificación por PCR consiste en exponer material genético a una solución con enzimas polimerasas termoestables (polimerasa taq), para que lo repliquen repetidamente y sea más sencillo su estudio. Para que el proceso funcione es necesario añadir nucleótidos para la síntesis del nuevo material, cebadores (secuencias específicas de ADN que activan a las polimerasas y delimitan la región a amplificar), una mezcla de iones (monovalentes y divalentes) en disolución y un termociclador que produce cambios de temperatura necesarios para la hibridación y separación del material genético en cada ciclo de replicación/amplificación.

La visualización del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, para lo que se utiliza 30 ml de Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, 0,75 g de agarosa y bromuro de etidio como marcador de recorrido.

4.2.2. Tipificación PCR/SSO

En la tipificación por el procedimiento PCR-SSO, una vez amplificado el ADN genómico se expone a una mezcla maestra que contiene las sondas específicas del locus a estudiar (SSO); posteriormente se observa en qué casos se ha producido la hibridación o unión de segmentos de ADN con su SSO específica.

La tecnología *Luminex* o *Microbeads Array* o ensayo en fase sólida, es una modificación del método PCR-SSO que permite el análisis de alta resolución manera masiva y rápida (*multiplex*). En este proceso cada sonda individual se une a una esfera Luminex única (existen hasta 100 tipos de esferas diferentes), pudiendo analizarse conjuntamente en el *Luminex Instrument*, capaz de distinguir cada tipo de esfera por su color de fluorescencia característico. De este modo se pueden analizar múltiples secuencias específicas del ADN amplificado, que hibriden con las diferentes SSO unidas a microesferas, en un mismo experimento.

El *Luminex Instrument* también mide las cantidades relativas de producto de PCR marcado que hibrida con cada microesfera Luminex. Así, al igual que ocurre con otros métodos SSO, la señal relativa obtenida con las sondas SSO puede utilizarse para asignar a las sondas una reactividad positiva o negativa con la muestra de ADN amplificado. Esto, a su vez, ofrece la información necesaria para determinar el fenotipo de la muestra.

4.3 GENOTIPAJE HLA A, B Y C.

El tipaje de los genes HLA-A, -B y -C, se realizó mediante el método de PCR-SSO utilizando los kits de tipificación *LIFECODEs HLA-SSO Clase I A,*

Clase I B, Clase I C y (*LifeCode, Inmucor GTI Diagnostic, Inc., Promega Corp.*), siguiendo las instrucciones del fabricante con el siguiente protocolo:.

4.3.1 Materiales y reactivos.

ADN genómico.
Mezcla maestra LIFECODES.
Solución diluyente (DS).
Taq polimerasa LIFECODES (10 U/ml).
Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE), 1 mg/ml.

4.3.2 Protocolo

El protocolo del fabricante consta de varios estadios para su consecución:

4.3.2.1 Amplificación de ADN.

- Colocar la Mezcla Maestra (*Master Mix*) del locus que se va a testar a temperatura ambiente (18-30 °C).
- Utilizar un vórtex para agitar los reactivos y a continuación microcentrifugar los tubos durante 5-10 segundos para que el contenido de los mismos se vaya al fondo del tubo.
- Preparar los componentes de amplificación para n + 1 muestras usando las cantidades indicadas para cada reactivo:

Componente	Cantidad por reacción PCR (por muestra)
Mezcla maestra LIFECODES	6 µl
ADN genómico 10-200 ng/µl	Total 80 ng

Polimeras taq LIFECODES	0.1 µl (1U)
Agua exenta de nucleasas	Hasta un volumen final de 20 µl

Añadir todos los reactivos excepto el ADN en un microtubo Eppendorf, agitar en un vórtex y mantener en baño de hielo.

- Pipetear 2 µl de ADN genómico (volumen suficiente para contener 80 ng de material genómico) en una placa o tubo de PCR.
- Pipetear 18 µl de la mezcla de amplificación en el pocillo de la placa (o tubo) de PCR.
- Tapar convenientemente la placa de PCR para prevenir la evaporación de la mezcla, y llevar al termociclador.

En el termociclador, ejecutar el programa siguiente para la amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>Paso 1</i>	95 °C	3 minutos	1
<i>Paso 2</i>	95 °C	15 segundos	12
	60 °C	30 segundos	
	72 °C	30 segundos	
<i>Paso 3</i>	95 °C	10 segundos	28
	63 °C	30 segundos	
	72 °C	30 segundos	
<i>Paso 4</i>	72°C	2 min	1
<i>Paso 4</i>	4 °C	∞	1

4.3.2.2 Hibridación:

- Calentar la mezcla de sondas específica a 55-60 °C durante 5 a 10 minutos para solubilizarla.

- Precalentar el termociclador para la hibridación a 56 °C.
- Homogeneizar la suspensión del vial con la mezcla de sondas durante 30 segundos mediante sonicación.
- Pipetear en cada pocillo de una placa de termociclador *Costar*TM 2,5 µl del producto de PCR específico y 7,5 µl de la mezcla de sondas.
- Agitar el vial de sondas específicas en un vórtex cada 8-10 muestras pipeteadas.
- Sellar la placa con papel de sellado *Microseal*TM.
- Mantener las muestras en el termociclador precalentado siguiendo el siguiente protocolo:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>Paso 1</i>	97 °C	2 minutos	1
<i>Paso 2</i>	47 °C	10 minutos	1
<i>Paso 3</i>	56 °C	8 minutos	1
<i>Paso 4</i>	Mantener a 56°C		

- Mientras las muestras hibridan con las sondas, preparar para n + 1 muestras la mezcla de DS y SA-PE (1:200), poniendo 100 µl de la solución diluyente (DS) y 0,45 µl de SA-PE por muestra. Esta mezcla es fotosensible por lo que debe mantenerse protegida de la luz hasta su uso.
- Una vez transcurridos los 20 minutos de hibridación, sin detener el programa ni sacar la placa del termociclador, se retira el papel de sellado y se diluye cada muestra con 100 µl de la mezcla DS/SA-PE (1:200) preparada anteriormente.
- Se retira la placa del termociclador y se lleva a adquirir y leer en el *Luminex Instrument*TM.

4.4.2.3. Análisis de las muestras

- La adquisición y lectura de las muestras se hizo con el programa *Luminex100 IS Software™* (Austin, Texas, Estados Unidos) en el citofluorómetro.
- Los resultados se analizaron con el software (MATCH IT! DNA v1.2 LIFECODES).

4.4 GENOTIPAJE DE GENES KIR.

El tipaje de genes KIR se efectuó mediante el KIT LIFECODES KIR SSO Typing Kit (Luminex technology, Tepnel Lifecodes, CMDCAS, Canada), de acuerdo con las especificaciones del fabricante, mediante el siguiente protocolo:

4.4.1 Materiales y reactivos

ADN genómico.
Mezcla Maestra (MX-K1 y MX-K2).
Mix de sondas (BM-K).
Solución diluyente (DS).
Taq polimerasa recombinante (10 U/ml).
Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE), 1 mg/ml.

4.4.2 Protocolo

Al igual que en el caso del tipaje de HLA de clase I, para el tipaje de genes KIR son precisas varias etapas diferenciadas:

4.4.2.1 Amplificación del ADN:

El multiplex de amplificación de los loci para KIR está dividido en dos reacciones de amplificación que utilizan el KIR-1 Master Mix (MX-K1) y el KIR-2 Master Mix (MXK2).

- Colocar la Mezcla Maestra (*Master Mix*) del locus que se va a testar a temperatura ambiente (18-30 °C).
- Utilizar un vórtex para agitar los reactivos y a continuación microcentrifugar los tubos durante 5-10 segundos para que el contenido de los mismos se vaya al fondo del tubo.
- Preparar los componentes de amplificación para n + 1 muestras usando las cantidades indicadas para cada reactivo:

Componente	Cantidad por reacción PCR (por muestra)
Master Mix (MX-K1 o MX-K2)	3 µl
ADN genómico 10-200 ng/µl	Total 50 ng
Polimeras taq	0.1 µl (1U)
Agua exenta de nucleasas	Hasta un volumen final de 10 µl

Añadir todos los reactivos excepto el ADN en un microtubo Eppendorf, agitar en un vórtex y mantener en baño de hielo.

- Pipetear 1 µl de ADN genómico (volumen suficiente para contener 50 ng de material genómico) en una placa o tubo de PCR.
- Pipetear 9 µl de la mezcla de amplificación en el pocillo de la placa (o tubo) de PCR.
- Tapar convenientemente la placa de PCR para prevenir la evaporación de la mezcla, y llevar al termociclador.

En el termociclador, ejecutar el programa siguiente para la amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>Paso 1</i>	95 °C	2 minutos	1
<i>Paso 2</i>	94 °C	30 segundos	40
	59 °C	90 segundos	
	72 °C	30 segundos	
<i>Paso 3</i>	72 °C	15 minutos	1
<i>Paso 4</i>	4 °C	∞	1

Cuando no exista la certeza de que la muestra ha amplificado correctamente se recomienda hacer una visualización del producto por electroforesis en gel de agarosa.

4.4.2.2 Hibridación:

- Calentar la mezcla de sondas (BM-K) a 55-60 °C durante 5 a 10 minutos para solubilizarla.
- Precalentar el termociclador para la hibridación a 56 °C.
- Homogeneizar la suspensión del vial con la mezcla de sondas BM-K durante 30 segundos mediante sonicación.
- Pipetear en cada pocillo de una placa de termociclador *Costar*TM 2,5 µl del producto de PCR específico y 7,5 µl de BM-K.
- Agitar el vial de BM-K en un vórtex cada 8-10 muestras pipeteadas.
- Sellar la placa con papel de sellado *Microseal*TM.

- Mantener las muestras en el termociclador precalentado durante 20 minutos para hibridar las muestras, en modo *HOLD*.
- Mientras las muestras hibridan con las sondas, preparar para $n + 1$ muestras la mezcla de DS y SA-PE (1:200), poniendo 100 μ l de la solución diluyente (DS) y 0,45 μ l de SA-PE por muestra. Esta mezcla es fotosensible por lo que debe mantenerse protegida de la luz hasta su uso.
- Una vez transcurridos los 20 minutos de hibridación, sin detener el programa ni sacar la placa del termociclador, se retira el papel de sellado y se diluye cada muestra con 100 μ l de la mezcla DS/SA-PE (1:200) preparada anteriormente.
- Se retira la placa del termociclador y se lleva a adquirir y leer en el Luminex Instrument™.

4.4.2.3. Análisis de las muestras

- La adquisición y lectura de las muestras se hizo con el programa *Luminex100 IS Software™* (Austin, Texas, Estados Unidos) en el citofluorómetro.
- Los resultados se analizaron con el software (MATCH IT! DNA v1.2 LIFECODES).

5. VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y EXPERIMENTALES.

Para su análisis posterior se agruparon las diferentes variables por tipos y también por su naturaleza cuantitativa o cualitativa, como sigue:

5.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS.

Fecha de nacimiento, edad y sexo en pacientes y controles.

5.2 VARIABLES CLÍNICAS.

Únicamente presentes en el grupo de pacientes con diagnóstico de AR.

- Fecha de diagnóstico de la AR.
- Cuestionario de calidad de vida (HAQ o Rapid3).
- Exploración con recuento articular de articulaciones tumefactas y dolorosas.
- Escala analógica de valoración de la actividad de la enfermedad por el médico y el paciente.
- Cálculo del índice DAS 28.
- Presencia o ausencia de erosiones en Rx manos y/o pies.
- Manifestaciones extraarticulares de la enfermedad: nódulos, afectación ocular, osteoporosis, serositis, vasculitis, carditis, neumonitis y eventos cardiovasculares.
- Datos de laboratorio: VSG, PCR, FR, ACPA, niveles de complemento (C3 y C4), ANOEs y ENAs.
- Tratamiento utilizado en el momento de la visita (corticoide, FAME, Biológico).
- Historia de exposición a tratamiento biológico: número de agentes biológicos utilizados.

La capacidad funcional de los pacientes se calculó sobre la base de la puntuación de los cuestionarios HAQ o Rapid3; para su adecuada comparación se estratificó a los pacientes en cuartiles (Q) según su puntuación, de forma que los pacientes se consideraron:

*Q1: Poca o nula afectación	HAQ (0-0.75)	Rapid 3 (< 3)
*Q2: Afectación leve	HAQ (0.76-1.50)	Rapid 3 (3.1-6)
*Q3: Afectación moderada	HAQ (1.51-2.25)	Rapid 3 (6.1-12)
*Q4: Afectación severa	HAQ (2.26-3.0)	Rapid 3 (>12)

La actividad de la enfermedad también se categorizó utilizando los puntos de corte descritos en la literatura respecto a la puntuación del índice DAS28 de actividad; resultando:

*Remisión:	DAS28 (<2.6)
*Baja actividad:	DAS28 (2.6 y <3.2)
*Moderada actividad:	DAS28 (3.2 y <5.1)
*Alta actividad:	DAS28 (\geq 5.1)

La valoración de la presencia de erosiones se realizó mediante la revisión de radiografías de manos y/o pies de la historia clínica de los pacientes. Únicamente se registró la presencia o ausencia de erosiones sin registrar la cantidad de ellas o la presencia de pinzamiento articular.

La presencia o ausencia de manifestaciones extraarticulares se realizó mediante la exploración física del paciente y la historia clínica. Se registraron aquellos pacientes con nódulos, afectación ocular, osteoporosis, serositis, vasculitis, carditis, neumonitis y eventos cardiovasculares.

Los reactantes de fase aguda se registraron de la analítica realizada el día de la visita y se utilizaron para calcular el DAS28. El resto de los parámetros se extrajeron de la historia clínica y aquellos que no se encontraron se estudiaron en laboratorio con las muestras de suero obtenidas para este estudio.

Los datos se registraron en una hoja de recogida de datos.

Sobre la base de esta recogida de datos se establecieron varios grupos de variables clínicas:

5.2.1. Variables cualitativas clínicas: Presencia de nódulos, osteoporosis, afectación ocular, serositis, vasculitis, afectación pulmonar, carditis, eventos cardiovasculares, erosiones, nivel de afectación de la calidad de vida, nivel actividad de la enfermedad.

5.2.2. Variables cualitativas de laboratorio: FR positivo o negativo, ACPA positivo o negativo, ambos positivos, ninguno positivo, ANA positivos o negativos, ANOEs positivos o negativos, tipo de ANOE positivo (Anti-célula parietal, anti-músculo liso, anti-mitocondrial, anti-DNA IgM, anti-DNA IgG); ENA positivos o negativos y tipo de ENA positivo (anti-Ro, anti-centrómero, anti-U1RNP, anti-Histona, anti-RNP70).

5.2.3. Variables cualitativas de tratamiento: tratamiento con corticoide (si/no), tratamiento con metotrexato (si/no), tratamiento con FAME (si/no), tratamiento con biológico (si/no), número de FAMEs en combinación, número de biológicos utilizados durante la evolución de la enfermedad.

5.2.4. Variables cuantitativas: Edad al diagnóstico, VSG, PCR, DAS28, título de FR, título de ACPA, niveles de C3 y C4.

5.3 VARIABLES EXPERIMENTALES.

Las variables experimentales se refieren a las obtenidas mediante el genotipado de las muestras mediante PCR-SSO.

5.3.1 Alelos HLA-A, HLA-B, HLA-C: A cada paciente se le asignan dos alelos HLA-A, dos alelos HLA-B y dos alelos HLA-C. Cada alelo se analiza de forma independiente.

5.3.2 Ligandos KIR.

Se establecen grupos tanto en HLA-C como en HLA-A y HLA-B en base a sus epítomos de unión a receptores KIR.

5.3.2.1: Grupos HLA-C: en función del aminoácido presente en la posición 80 de la hélice α -1 de la molécula de HLA de clase I.

- El grupo C1 se caracteriza por presentar el aminoácido asparraguina (Asn) en la posición 80 e incluye a los alelos HLA-Cw *01, *03, *07, *08, *12, *14 y *16:01.
- El grupo C2 presenta lisina (Lys) en la posición 80 y engloba a los alelos HLA-Cw *02, *04, *05, *06, *15, *16:02, *17 y *18.

Los pacientes se agruparon en cuatro grupos en función de sus dos alelos HLA-C:

1. C1C1: Ambos alelos pertenecen al grupo C1.
2. C1C2: Un alelo del grupo C1 y otro alelo del grupo C2.
3. C2C2: Ambos alelos pertenecen al grupo C2.
4. C1X: Al menos un alelo pertenece al grupo C1.

5.3.2.2 Grupos HLA Bw4/Bw6: El epítipo Bw4 está presente en alelos HLA-B (*05, *5102, *13, *17, *27, *37, *38, *44, *47, *49, *51, *53, *57, *58, *59, *63 y *77) y algunos alelos HLA-A (*09, *23, *24, *2403, *25, *32). Aquellos alelos que no presentan el epítipo Bw4 corresponden al llamado epítipo Bw6.

Los pacientes se agruparon también en varios grupos en función de sus dos alelos HLA-A y HLA-B:

1. Grupo Bw4 homo: Pacientes con dos alelos del grupo Bw4.
2. Grupo Bw4: Pacientes con al menos un alelo del grupo Bw4.
3. Grupo Bw6 homo: Pacientes con dos alelos del grupo Bw6.
4. Grupo Bw6: Pacientes con al menos un alelo del grupo Bw6.

5.3.3 Genes, genotipo y haplotipo KIR.

5.3.3.1 Genes KIR: A cada paciente se le asignan los genes KIR presentes en su ADN.

5.3.3.2 Genotipo KIR: A cada paciente se le asigna un genotipo KIR, en función de su repertorio de genes KIR.

5.3.3.3 Haplotipo KIR: A cada paciente se le asigna un grupo genérico de haplotipo KIR A o B, en función de su genotipo KIR.

5.3.3.2 Haplotipo KIR centromérico y telomérico: En función de su repertorio KIR, en cada paciente se identifica si son portadores de haplotipos KIR A01 o B01 centromérico o telomérico, siguiendo la siguiente secuencia lógica:

- A01 centromérico (cA01): Pacientes con KIR2DL3 presente.

- A01 telomérico (tA01): Pacientes con KIR2DS4 presente.
- B01 centromérico (cB01): Pacientes con presencia simultánea de KIR2DL2, KIR2DL5 y KIR2DS3.
- B01 telomérico (tB01): Pacientes con presencia simultánea de KIR2DL5 + KIR2DS1 + (KIR2DS3 o KIR2DS5).

6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Los datos del estudio se recogieron en una hoja de recogida de datos y posteriormente se pasaron a una base de datos Microsoft Access 2.0 (Microsoft Corporation, Seattle, WA). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago IL).

Para detectar diferencias respecto a variables cuantitativas (edad, actividad clínica, título de anticuerpos y complemento y dosis de corticoide) se realizó un test t-Student desapareado de dos colas. Para las variables cualitativas (sexo, manifestaciones clínicas, categorías de calidad de vida y actividad clínica, variables cualitativas de laboratorio y tratamiento), se realizó un test Chi cuadrado (χ^2) de Pearson. Las frecuencias alélicas, génicas y genotípicas fueron estimadas por conteo directo y comparadas utilizando el test exacto de Fisher bilateral. Las asociaciones de los alelos o genes KIR con las variables cuantitativas clínicas se estimaron mediante el test de Chi Cuadrado (χ^2) y el test exacto de Fisher bilateral; para determinar la magnitud del efecto de las asociaciones se calculó la razón relativa (odds ratio: OD. El valor de "Pc" se obtuvo multiplicando el valor de "p" por el número de alelos probados para cada locus (corrección de Bonferroni) (183). Los valores de "p" menores de 0.05 fueron considerados como significativos. La correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante la prueba de correlación de Spearman, expresada mediante el coeficiente Rho de Spearman.

RESULTADOS

OBJETIVO 1. Descripción de la cohorte de pacientes con artritis reumatoide y población control.

1.1 COHORTE DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.

En esta cohorte se incluyeron 151 pacientes con diagnóstico de AR, seleccionados en dos momentos diferentes, entre octubre de 2004 y febrero de 2005 y desde 2014 a 2015. Los pacientes se incluyeron de forma consecutiva cuando acudían para la infusión de tratamiento biológico intravenoso y se aprovechó la venopunción para solicitar la muestra (un tubo con EDTA y un tubo seco); esta población es fundamentalmente AR crónica de larga evolución. Un subgrupo de pacientes se obtuvo de una consulta de remisión en la que había pacientes de reciente diagnóstico y buen control inicial de la enfermedad.

1.1.1 Variables demográficas:

La distribución por sexo de los pacientes resultó en 121 mujeres (80,1 %) y 30 hombres (19.9%). La edad media al diagnóstico en ambos sexos fue de 42.62 ± 13.43 años. En el momento de su inclusión en el estudio, los pacientes tenían una media de edad de 56.32 ± 12.48 años, con una media de seguimiento desde el debut de 162 ± 131.48 meses, con un mínimo de 1 mes y un máximo de 577 meses.

1.1.2 Variables cualitativas clínicas:

Respecto a las características clínicas de los pacientes, en 85 pacientes (56.7%) se objetivaron erosiones óseas en radiografías de manos y/o pies. Cuarenta y siete pacientes (31.1%) presentaban afectación ocular atribuible a su artritis reumatoide, 36 pacientes (26.8%) presentaban una osteoporosis establecida, 25 pacientes (16.8%) nódulos reumatoides, 15 pacientes (9.9%) una enfermedad intersticial pulmonar, 14 pacientes (9.3%) tenían antecedente de evento

cardiovascular, 8 pacientes (5.3%) habían presentado vasculitis cutánea, 6 pacientes (4%) serositis y 5 pacientes (3.3%) carditis (Tabla 1).

En cuanto a la calidad de vida, 58 pacientes (38.4%) presentaban una calidad de vida aceptable o buena, 51 pacientes (33.8%) presentaron una afectación leve de su calidad de vida, 28 pacientes (18.5%) una afectación moderada de su calidad de vida y 14 pacientes (9.3%) presentaban una severa afectación de su calidad de vida (Tabla 2).

La actividad inflamatoria medida por DAS 28 de los pacientes mostró que 26 pacientes estaban en remisión (17.2%), 22 con baja actividad de la enfermedad (14.6%), 46 con actividad moderada (47.7%) y 31 con alta actividad de la enfermedad (20.5%). (Tabla 2).

TABLA 1. DEMOGRAFÍA, EVOLUCIÓN Y CLÍNICA EN COHORTE DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE		Pacientes n = 151 (%)
SEXO	MUJER	121 (80,1)
	HOMBRE	30 (19,9)
EDAD INCLUSIÓN. Media en años (DE)		56,32 ± 12,48 [26-81]
EDAD DEBUT AR. Media en años ± DE [min-máx]		42,62 ± 13,43 [12-73]
TIEMPO EVOLUCIÓN . Media en meses ± DE [min-máx]		162 (131,28) [1-577]
EROSIONES RX	PRESENTES	85 (56,7)
	AUSENTES	66 (47,3)
OSTEOPOROSIS		36 (26,8)
NÓDULOS		25 (16,6)
AFECTACIÓN OCULAR		47 (31,1)
Serositis		6 (4)
Vasculitis		8 (5,3)
Neumopatía		15 (9,9)
Carditis		5 (3,3)
Eventos Cardiovasculares		14 (9,3)
DE: Desviación estándar. min: mínimo. máx: máximo. AR: Artritis Reumatoide. RX: Radiografía simple		

1.1.3. Variables cuantitativas de laboratorio:

Los reactantes de fase aguda presentaron una leve elevación media con alta variabilidad entre los distintos pacientes atendiendo a la desviación estándar de las medias y valores máximo y mínimo, que resultaron ser de $24,24 \pm 19,558$ (2-100) para la Velocidad de Sedimentación Globular y de $0,73 \pm 1,32$ (0-7,6). para la Proteína C Reactiva. Los niveles medios de las fracciones de complemento C3 y C4 se mantuvieron dentro de parámetros normales, aunque también con una alta variabilidad entre pacientes; resultando una media, desviación típica y horquilla de mínimo y máximo de $122,45 \pm 31,493$ (64-247) para C3 y $24,96 \pm 10,982$ (4-64) para C4. (Tabla 2).

TABLA 2. REACTANTES, ACTIVIDAD INFLAMATORIA Y CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES CON AR		Pacientes n = 151 (%)
VSG . Media (mm/h) \pm DE [max-min]		24,24 \pm 19,558 [2-100]
PCR. Media (mg/dL) \pm DE [max-min]		0,73 \pm 1,32 [0-7,6]
COMPLEMENTO C3. Media \pm DE		122,45 \pm 31,493 [64-247]
COMPLEMENTO C4. Media \pm DE		24,96 \pm 10,982 [4-64]
DAS-28	Remisión	26 (17,2)
	Actividad baja	22 (14,6)
	Actividad moderada	72 (47,7)
	Actividad alta	31 (20,5)
HAQ/ RAPID3	Poca o nula afectación	58 (38,4)
	Afectación leve	51 (33,8)
	Afectación moderada	28 (18,5)
	Afectación severa	14 (9,3)
VSG: Velocidad de Sedimentación Globular, DE: desviación estándar, PCR: Proteína C Reactiva, DAS-28: <i>Disease Activity Index 28</i> , HAQ: <i>Health Assessment Quality of life</i> , RAPID 3: <i>Routine Assessment of Patient Index Data 3</i> .		

1.1.4. Variables cualitativas de laboratorio:

Desde el punto de vista inmunológico 82 pacientes (54.3%) presentaban Factor Reumatoide positivo, 105 pacientes tenían ACPA positivo (69.5%), 75 pacientes presentaban doble positividad (49.7%) y

40 doble negatividad (26.5%); 111 pacientes (73.5%) presentaban positividad para ACPA o Factor Reumatoide. Un total de 62 pacientes (41.1%) fueron ANA positivo y 48 pacientes (31.7%) presentaron positividad para ANOEs. Entre los ANOEs positivos el más frecuentemente observado fue el anti DNA IgM en 30 pacientes (19.8%), anti células parietales en 13 pacientes (8.6%), anti mitocondriales en 3 pacientes (2%), anti músculo liso en 2 pacientes (1.3%) y anti DNA IgG en un paciente (0.7%). Respecto a los anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENAs), fueron positivos en 10 pacientes (6.6%), sin reportar especificidad en 2 de ellos (1.3%), anti SSA-Ro en 2 pacientes (1.3%), anti Histona en 2 pacientes (1.3%), anti U1RNP en 2 pacientes (1.3%), anti centrómero 2 pacientes (1.3%), anti RNP70 y anti SSB-La en 1 paciente cada uno (0.7%), (Tabla 3).

TABLA 3. PARÁMETROS ANALÍTICOS AUTOINMUNES EN PACIENTES CON AR		POSITIVOS N/TOTAL (%)
FACTOR REUMATOIDE (>20 U/mL)		82/151 (54,3)
ACPA (>10 U/mL)		105/151 (69,5)
	DOBLE POSITIVO	75/151 (49,7)
	DOBLE NEGATIVO	40/151 (26,5)
	FR Y/O CCP POSITIVO	111/151 (73,5)
ANA (hep-2) >1/160		62/151 (41,1)
ANTÍGENOS NO ÓRGANO ESPECÍFICOS (ANOES)	48/151 (31,7)	Negativo 104 (69,3)
		DNA IgM 30 (19,8)
		Cel. Parietal 14 (9,2)
		Mitocondrial 3 (2)
		M. Liso 2 (1,3)
		DNA IgG 1 (0,7)
ANTÍGENOS EXTRAÍBLES DEL NÚCLEO (ENAS)	10/150 (6,6)	Negativo 140 (92,7)
		N/E Positivo 2 (1,3)
		SSB (Ro) 2 (1,3)
		U1RNP 2 (1,3)
		Centrómero 2 (1,3)
		Histona 2 (1,3)
		SSA (La) 1 (0,7)
		RNP70 1 (0,6)
U/mL: Unidades por mililitro. ACPA: <i>Anti-Citrullinated-Protein-Antibodies</i> . ANA: antinuclear-Antibodies. Hep-2: <i>Human epithelial cells 2</i> . N/E Positivo: positivo no especificado.		

1.1.5. Variables de tratamiento:

Respecto a los tratamientos utilizados en los pacientes, 84 de ellos (56.2%) recibían corticoide en el momento de la inclusión en el estudio, en la mayoría de los casos a dosis bajas; recibían metilprednisolona 59 pacientes (39%) a una dosis media de $3.45 \text{ mg} \pm 2.08$, prednisona 18 pacientes (12%) a una dosis media de $5.34 \text{ mg} \pm 2.41$ y deflazacort 6 pacientes (4%) a una dosis media de $7.5 \text{ mg} \pm 4.3$.

Respecto a los FAMEs, 119 pacientes (78.8%) estaban expuestos a ellos y de ellos 93 pacientes (61.5%) tomaban metotrexato, 31 pacientes (20.5%) leflunomida, 2 pacientes (1.3%) hidroxicloroquina, y un solo paciente (0.6%) con azatioprina, ciclosporina A o sulfasalazina. Siete pacientes (5%) estaban en terapia combinada, cinco de ellos en doble terapia y dos pacientes en triple terapia. Los fármacos utilizados para la terapia combinada fueron metotrexato en seis de los casos, leflunomida en cinco casos y la hidroxicloroquina, ciclosporina y sulfasalazina siempre se usaron en combinación con otros FAMEs.

Respecto a los FAMEb, se registraron 191 tratamientos en 134 pacientes (89%); 91 de ellos (60.2%) recibieron infliximab, 28 tocilizumab (18%), 23 adalimumab (15%), 20 rituximab (13%), 14 etanercept (9.2%), 10 abatacept (6.6%) y un paciente (0.7%) golimumab. La mayoría de ellos (102 pacientes) estaban recibiendo su primer FAMEb, 18 precisaron un segundo agente, 8 un tercero, 5 un cuarto FAME biológico y dos pacientes estaban recibiendo su quinto agente biológico. (Tabla 4).

TABLA 4. TRATAMIENTOS EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

TIPO DE TRATAMIENTO	PRINCIPIO ACTIVO	TRATAMIENTOS N= 403 (%)
CORTICOIDE: 84 (56) N pacientes (dosis mg ± DE)	METIL-PREDNISOLONA	59 (Dosis 3,45 ± 2,08)
	PREDNISONA	18 (Dosis 5,34 ± 2,41)
	DEFLAZACORT	6 (Dosis 7,5 ± 4,13)
	CELESTONE® MENSUAL	1
TOTAL CORTICOIDES		84 (21)
FAME sintético: 119 (79) Terapia combinada: 7 *Doble terapia = 5 *Triple terapia = 2	METOTREXATO	92 (6 combinados)
	LEFLUNOMIDA	31 (5 combinados)
	HIDROXICLOROQUINA	2 (2 combinados)
	AZATIOPRINA	1
	CICLOSPORINA	1 (1 combinada)
	SULFASALAZINA	1 (1 combinada)
TOTAL FAME sintético		128 (32)
FAME biológico: 134 (89) *Primero = 101 *Segundo = 18 *Tercero = 8 *Cuarto = 5 *Quinto = 2	INFLIXIMAB	92
	TOCILIZUMAB	30
	ADALIMUMAB	24
	RITUXIMAB	20
	ETANERCEPT	16
	ABATACEPT	7
	GOLIMUMAB	2
TOTAL FAME biológico		191 (47)

mg: miligramos; DE: desviación estándar; FAME: Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad.

1.1.6 Análisis de asociación de variables en la cohorte de pacientes:

Los pacientes presentaron erosiones radiográficas en el 56.7% de las radiografías de manos y/o pies; la enfermedad erosiva se asoció a una mayor presencia de osteoporosis ($p = 0.022$), mayor actividad de la enfermedad ($p = .021$), positividad para ACPA ($p = 0.002$) y/o FR ($p = .013$), una media de VSG más elevada ($p = .025$), mayor edad en el momento de inclusión en el estudio ($p < 0.001$) y más tiempo de evolución de la AR ($p = 0.007$).

Cuarenta y siete pacientes (31.1%) presentaban complicaciones oculares. No se encontraron asociaciones significativas en los pacientes con

síntomas oculares respecto a la calidad de vida, actividad de la enfermedad, presencia de erosiones ni el resto de manifestaciones extraarticulares.

Treinta y seis pacientes (26.8%) presentaban una osteoporosis establecida y la presencia de osteoporosis se asoció significativamente con una mayor edad en el momento de la inclusión en el estudio ($p < 0.001$), un mayor tiempo de evolución de la enfermedad ($p = 0.004$) y una menor tasa de positividad y título medio de FR ($p = 0.001$). No se encontró asociación con otras complicaciones extraarticulares, calidad de vida, actividad de la enfermedad ni presencia de erosiones.

Veinticinco pacientes (16.8%) presentaron nódulos reumatoides y se asociaron con mayor frecuencia positividad para ACPA ($p .032$), FR ($p = 0.007$), positividad para ambos ($p = 0.013$) y también un aumento significativo del riesgo de carditis ($p = 0.032$) y neumopatía ($p = 0.028$); también fueron más frecuentes los eventos vasculares ($p > 0.05$). No encontramos diferencias en cuanto a la calidad de vida, actividad de la enfermedad, presencia de erosiones ni el resto de manifestaciones extraarticulares.

Quince pacientes (9.9%) presentaban neumopatía, que se asoció significativamente con la presencia de nódulos reumatoides ($p = 0.028$). Se encontró también una mayor frecuencia serositis, carditis y vasculitis ($p > 0.05$).

Catorce pacientes (9.3%) tenían antecedente de evento cardiovascular y se relacionaron con una mayor media de edad en el momento de la inclusión ($p = 0.005$) y mayor actividad inflamatoria con menor tasa de remisión ($p = 0.006$).

Ocho pacientes (5.3%) habían presentado vasculitis cutánea se asociaron significativamente a la presencia de serositis ($p = 0.033$), una peor calidad de vida ($p = 0.048$) y un título medio de ACPA menor ($p = 0.035$).

Seis pacientes (4%) presentaron serositis y se asociaron clínicamente con vasculitis ($p = 0.033$).

Cinco pacientes (3.3%) con carditis se asociaron con la presencia de nódulos reumatoides ($p = 0.032$), una peor calidad de vida ($p < 0.001$) y una mayor puntuación media de DAS28 ($p = 0.026$).

Los pacientes con mayor actividad de la enfermedad en el momento de su inclusión en el estudio presentaron una significativamente peor calidad de vida ($p < 0.001$).

1.2 COHORTE DE SUJETOS GRUPO CONTROL.

Para el análisis comparativo de las frecuencias de HLA de clase I y KIR se incluyeron en el grupo control 150 individuos sanos, con una distribución por sexo de 121 mujeres y 30 hombres, con una media de edad de 42.62 ± 13.43 años [21-67]. No hubo diferencias significativas respecto al sexo ni en cuanto a la edad respecto al grupo de pacientes en el momento del diagnóstico de la Artritis Reumatoide.

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS CASO-CONTROL		CONTROLES N= 150	PACIENTES N= 151	Significación estadística
SEXO	MUJER	117	121	0,672 _a
	HOMBRE	33	30	
EDAD media en años \pm DE [min-máx]		45,12 \pm 10,57 [12-73]	42,62 \pm 13,43 [21-67]	0,073 _o

DE: Desviación estándar. _a Prueba exacta de Fisher (Chi cuadrado). _o Comparación de medias de muestras independientes (t de Student).

OBJETIVO 2. Analizar las diferencias de frecuencias alélicas del HLA clásico de clase I (A, B y C) entre pacientes con Artritis Reumatoide y controles.

En primer lugar, se compararon las frecuencias alélicas de los distintos alelos analizados en los HLA de clase I (A, B y C). Los análisis resultaron válidos para el estudio de HLA-A en 145 controles y 140 pacientes, para el HLA-B se obtuvieron 145 controles y 144 pacientes, mientras que para el HLA-C se obtuvieron resultados para 147 controles y 150 pacientes.

2.1 HLA-A.

Se observó un total de 18 alelos diferentes en casos y controles, algunos con baja frecuencia y en el caso del alelo A*39 únicamente se observó un caso en el grupo de pacientes y en el de A*69 un único caso en el grupo de controles.

TABLA 6. ESTUDIO FRECUENCIAS ALÉLICAS CASO-CONTROL HLA-A

HLA-A	CONTROLES 290 (N = 145 x 2) N (%)	PACIENTES 280 (N = 140 x 2) N (%)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	RIESGO OR (95% IC)
A*01	34 (12)	30 (11)	0,790	-
A*02	70 (24)	82 (29)	0,184	-
A*03	26 (9)	22 (8)	0,654	-
A*11	13 (4)	14 (5)	0,845	-
A*23	7 (2)	12 (4)	0,248	-
A*24	23 (8)	28 (10)	0,463	-
A*25	7 (2)	4 (1)	0,545	-
A*26	16 (6)	10 (4)	0,318	-
A*29	23 (8)	21 (8)	0,876	-
A*30	21 (7)	18 (6)	0,742	-
A*31	7 (2)	7 (3)	1,000	-
A*32	8 (2)	8 (5)	1,000	-
A*33	12 (8)	3(2)	0,033§	0,24 (0,06-0,88)
A*34	2 (1)	1 (1)	1,000	-
A*39	0 (0)	1 (1)	0,491	-
A*66	3 (1)	1 (1)	0,624	-
A*68	18 (6)	17 (6)	1,000	-
A*69	0 (0)	1 (1)	0,491	-

OR: Razón de probabilidades (Odds ratio), IC: Intervalo de confianza. §: p valor corregido (pc) > 0.05.

Las frecuencias de los distintos alelos observados fueron superponibles pacientes y controles, menos en el caso de alelo A*33, que resultó menos frecuente en el grupo de pacientes (3 casos, 2%) respecto a los controles (12 casos, 8%) ($p = 0.033$, $pc > 0.05$) OR 0.24 (0.06-0.88). (Tabla 6).

2.2 HLA-B.

Se observó un total de 28 alelos diferentes en casos y controles, algunos con baja frecuencia; los alelos B*24, B*37, B*48 y B*56 no se observaron en el grupo control y el alelo B*47 no se observó en el grupo de pacientes.

En la mayoría de las frecuencias alélicas HLA-B no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, salvo para B*38 y B*39. En el caso de B*38, el alelo en el grupo control estuvo presente en 11 individuos (4%), frente a 2 individuos (1%) en el grupo de pacientes, con significación estadística ($p = 0.035$, $pc > 0.05$), OR 0.20 (0.04-0.92). El alelo B39, en el grupo control estuvo presente en 3 individuos (1.6%), frente a 11 individuos (7.6%) en el grupo de pacientes ($p = 0.028$, $pc > 0.05$), OR 4.05 (1.11-14.84). (Tabla 7).

TABLA 7. ESTUDIO FRECUENCIAS ALÉLICAS CASO-CONTROL HLA-B

HLA-B	CONTROLES 290 (145 x 2) N (%)	PACIENTES 288 (144 x 2) N (%)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	RIESGO OR (95% IC)
B*07	25 (8)	24 (8)	1,000	
B*08	17 (6)	23 (14)	0,308	
B*13	2 (1)	4 (1)	1,000	
B*14	19 (7)	16 (6)	0,728	
B*15	19 (7)	18 (6)	1,000	
B*18	29 (10)	21 (7)	0,300	
B*24	0 (0)	1 (1)	0,499	
B*27	7 (2)	8 (3)	0,800	
B*35	22 (8)	26 (9)	0,550	
B*37	1 (1)	5 (2)	0,115	
B*38	10 (4)	2 (1)	0,035§	0.20 (0.04-0.92)
B*39	3 (1)	11 (4)	0,028§	4.05 (1.11-14.84)
B*40	11 (4)	16 (6)	0,332	
B*41	5 (2)	3 (1)	0,725	
B*42	1 (1)	1 (1)	1,000	
B*44	38 (13)	45 (16)	0,342	
B*45	9 (3)	3 (1)	0,142	
B*47	1 (1)	0 (0)	0,499	
B*48	0 (0)	1 (1)	0,498	
B*49	19 (7)	16 (6)	0,727	
B*50	6 (2)	8 (3)	0,601	
B*51	21 (7)	16 (6)	0,497	
B*52	5 (2)	4 (1)	1,000	
B*53	5 (2)	4 (1)	1,000	
B*55	6 (2)	3 (1)	0,504	
B*56	0 (0)	2 (1)	0,248	
B*57	5 (2)	6 (2)	0,771	
B*58	3 (1)	1 (1)	0,624	

OR: Razón de probabilidades (Odds ratio), IC: Intervalo de confianza. §: p valor corregido (pc) > 0.05.

2.3 HLA-C.

Se observó un total de 15 alelos diferentes entre casos y controles, algunos con baja frecuencia y el alelo C*1635 únicamente se observó en el grupo de pacientes.

Las frecuencias alélicas en el HLA-C no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (Tabla 8).

TABLA 8. ESTUDIO FRECUENCIAS ALÉLICAS CASO-CONTROL HLA-C

HLA-C	CONTROLES 294 (N = 147 x 2) N (%)	PACIENTES 300 (N = 150 x 2) N (%)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
C*01	8 (3)	9 (3)	1,000
C*02	12 (4)	13 (4)	1,000
C*03	29 (10)	28 (10)	0,889
C*04	31 (10)	35 (10)	0,697
C*05	30 (10)	32 (10)	0,894
C*06	22 (7)	32 (11)	0,200
C*07	71 (24)	81 (27)	0,453
C*08	21 (7)	16 (5)	0,399
C*12	22 (7)	16 (5)	0,299
C*14	5 (2)	5 (2)	1,000
C*15	9 (3)	10 (4)	1,000
C*1601	21 (7)	16 (5)	0,399
C*1602	5 (2)	2 (1)	0,284
C*1635	0	2 (1)	0,499
C*17	6 (2)	4 (1)	0,542

OBJETIVO 3. Analizar las diferencias de frecuencias alélicas de ligandos KIR entre pacientes con AR y controles: en HLA-C en función de su dimorfismo en las posiciones 77 y 80 de la cadena alfa1 (C1, C2 respectivamente); en HLA-A y HLA-B en función del dimorfismo en posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (Bw4, Bw6).

A continuación, se exploraron los distintos ligandos KIR agrupándolos en función de los aminoácidos claves en C1, C2, Bw4 y Bw6. Teniendo en cuenta ambos alelos de cada individuo, para cada condición se compararon tanto pacientes homocigotos como heterocigotos.

Este análisis no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, aunque hubo 27 individuos (18%) del grupo de pacientes que presentaban alelos C2-C2 frente a 19 individuos (13%) del grupo control, aunque sin alcanzar significación estadística. (Tabla 9).

TABLA 9. ESTUDIO CASO-CONTROL DE LIGANDOS KIR EN HLA-C (GRUPOS C1/C2) Y HLA-A ,B (GRUPOS Bw4 Y Bw6)

LIGANDO KIR HLA-C	CONTROLES N/TOTAL (%)	PACIENTES N/TOTAL (%)	SIGNIFICACION ESTADÍSTICA
C1-C1	51/147 (35)	45/149 (30)	0.681
C1-C2	77/147 (52)	77/149 (52)	0.903
C2-C2	19/147 (13)	27/149 (18)	0.217
C1X	128/147	122/149	0.328
Bw4 individuos	109/146 (74)	109/151 (72)	0.694
Bw4 homocigotos	39/146 (27)	37/151 (25)	0.691
Bw6 individuos	113/145 (78)	114/151 (75)	0.681
Bw6 homocigotos	42/145 (29)	43/151 (28)	1,000

OBJETIVO 4. Analizar las frecuencias alélicas de genes y haplotipos KIR entre casos y controles.

4.1 GENES KIR.

Se observaron un total de 12 genes KIR diferentes en casos y controles, todos ellos con buena representación en ambos grupos.

En la mayoría de las frecuencias alélicas para los diferentes genes KIR no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, salvo para KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR3DS1. KIR2DL5 estuvo presente en 74 individuos del grupo control (49%) y en 92 individuos (61%) del grupo de pacientes, diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p = 0.049$, $p < 0.05$), OR 1.60 (1.01-2.53). KIR2DS3 estuvo presente en 37 individuos del grupo control (25%) frente a 62 individuos (41%) del grupo de

pacientes, lo que resultó altamente significativo ($p = 0.003$, $pc = 0.036$), OR 2.13 (1.30-3.48). Respecto a KIR3DS1, hay que señalar que estuvo presente en 60 individuos (41%) del grupo control frente a 81 individuos (54%) del grupo de pacientes, resultando esta diferencia también significativa desde el punto de vista estadístico ($p = 0.021$, $pc > 0.05$), OR 1.73 (1.01-2.74). (Tabla 10).

TABLA 10. ESTUDIO FRECUENCIAS DE GENES KIR CASO-CONTROL

KIR	CONTROLES N=150 n (%)	PACIENTES N = 151 n (%)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	RIESGO OR (95%CI)
INHIBIDORES				
KIR 2DL1	146 (97)	140(92)	0,109	-
KIR 2DL2	78 (52)	93 (61)	0,104	-
KIR 2DL3	138 (92)	131 (87)	0,190	-
KIR 2DL5	74 (49)	92 (61)	0,049§	1.60 (1.01-2.53)
KIR 3DL1	140 (93)	145 (96)	0,318	-
ACTIVADORES				
KIR 2DS1	63 (42)	73(48)	0,298	-
KIR 2DS2	79 (53)	94 (62)	0,103	-
KIR 2DS3	37 (25)	62 (41)	0,003¥	2.13 (1.30-3.48)
KIR 2DS4	139 (93)	144 (95)	0,343	-
KIR 2DS5	48 (32)	53 (35)	0,626	-
KIR 3DS1	60 (41)	81 (54)	0,021§	1.73 (1.01-2.74)
KIR 2DP1	151(98,1)	146 (96,7)	0,498	-

OR: Razón de probabilidades (Odds ratio), IC: Intervalo de confianza. §: p valor corregido ($pc > 0.05$). ¥: $pc = 0,036$.

4.2 GENOTIPOS KIR.

TABLA 11. ESTUDIO GENOTIPO KIR CASO-CONTROL

GENOTIPO KIR	TOTAL (301)	CONTROLES (N = 150)	PACIENTES (N = 151)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	RIESGO OR (95% IC)
AA	72	48	24	0.001	0.40 (0.23-0.69)
AB	30	8	22	0.011	3.02 (1.30-7.03)
AB (1,38)	1	0	1	1	-
AB (1, 39)	1	0	1	1	-
AB1	42	24	18	0.32	-
AB2	18	9	9	1	-
AB3 B2B6	20	6	14	0.10	-
AB4	18	5	13	0.08	-
AB5	19	11	8	0.48	-
AB6	30	16	14	0.7	-
AB9	2	1	1	1	-
B1B1	1	1	0	1	-
B1B2 B2B2	3	1	2	1	-
B1B2 B2B3	1	0	1	1	-
B1B4 B2B4	6	3	3	1	-
B1B5	1	1	0	1	-
B2B3 B2B5	2	2	0	0.24	-
B3B6 B4B7 8 9 B4B6	5	3	2	0.68	-
B5B6	4	4	0	0.06	-
B6B6	4	2	2	1	-
BB	19	6	13	0.15	-
BB(2,37)	2	0	2	0.49	-

OR: Razón de probabilidades (Odds ratio), IC: Intervalo de confianza

A continuación, se exploraron los distintos genotipos KIR de forma individualizada. En este análisis se obtuvieron varios resultados estadísticamente significativos. El genotipo AA estuvo presente en 48 (32%) controles y en 24 pacientes (16%), con una OR de 0.40 y un intervalo de confianza de 0.23 a 0.69 ($p = 0.001$). Por su parte el genotipo AB se presentó en 22 pacientes (14.5%) y 8 controles (5%), lo que arrojó un OR de 3.02 (1-30-

7.03) ($p = 0.011$). El resto de los genotipos no presentaron asociación estadísticamente significativa. (Tabla 11).

4.2 HAPLOTIPOS KIR.

Seguidamente se estudió la asociación de haplotipos KIR, agrupando a los individuos del estudio en AA o Bx en función de si presentaban o no genes KIR correspondientes al haplotipo B. Este análisis resultó en una clara diferencia entre el grupo de pacientes y controles, siendo significativamente más frecuente el haplotipo AA en los controles con 49 casos (32%) frente a 24 casos (16%) en el grupo de pacientes, mientras que el haplotipo Bx resultó en 105 casos (68%) en el grupo de controles frente a 127 casos (84%) en el grupo de pacientes con AR. Estas diferencias arrojaron también un alto grado de significación estadística ($p = 0.001$), con un OR para haplotipo AA de 0.40 (0.23-0.69) y para haplotipo Bx de 2.49 (1.42-4.33). (Tabla 12).

TABLA 12. ESTUDIO CASO-CONTROL HAPLOTIPOS AGRUPADOS (AA, Bx)

HAPLOTIPO KIR	CONTROLES (N = 150) N (%)	PACIENTES (N = 151) N(%)	SIGNIFICACION ESTADÍSTICA	RIESGO OR(95% IC)
AA	48 (32)	24 (15,9)	0.001	0.40 (0.23-0.69)
BX	102 (68)	127 (84,1)	0.001	2.49 (1.42-4.33)

OR: Razón de probabilidades (Odds ratio), IC: Intervalo de confianza

A continuación, se exploraron las frecuencias de haplotipos A01 y B01 teloméricos y centroméricos, obteniendo diferencias significativas en el caso del cB01, presente en 54 pacientes y 31 controles ($p = 0.003$), OR 2.13 (1.27-3.78). (Tabla 13).

TABLA 13. ESTUDIO CASO-CONTROL DE FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS KIR CENTROMÉRICOS Y TELOMÉRICOS					
HAPLOTIPO c/t KIR (N)	CONFORMACION KIR HAPLOTIPO	PACIENTES	CONTROLES	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA	RIESGO OR (95%CI)
∄ tA01 + ∄ cA01 (3)	∄ KIR2DL3 + ∄ KIR2DS4	2	1	ns	
∄ tA01 (18)	∄ KIR2DS4	6	12	ns	
∄ cA01 (32)	∄ KIR2DL3	20	12	ns	
tB01 (135)	∃ KIR2DL5 + KIR2DS1 + KIR2DS3 ó 2DS5	75	60	ns	
cB01 (85)	∃ KIR2DL2 + KIR2DL5 + KIR2DS3	54	31	0.003	2.13 (1.27-3.78)

∄: No presente; ∃: Presente; c: centromérico; t: telomérico OR: Razón de probabilidades (Odds Ratio); IC: Intervalo de confianza

OBJETIVO 5. Estudiar las combinaciones HLA/KIR en los pacientes con AR en relación con las de la población control.

El estudio de combinaciones HLA y KIR se realizó en varias fases:

5.1 Ligandos KIR en base a dimorfismo en posición 80 de cadena alfa 1 de HLA-C frente a genes KIR y haplotipos KIR.

En primer lugar, se seleccionaron los casos homocigotos para C1 (C1C1), comparando las frecuencias de haplotipos KIR y presencia de diferentes genes KIR entre pacientes y controles. Este análisis estadístico no arrojó diferencias significativas.

A continuación, se analizaron los casos homocigotos para C2 (C2C2) y en este caso sí que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. En concreto KIR2DL3 estuvo presente en todos los controles mientras que en 6 de los 27 pacientes con AR (22%), no estaba presente ($p = 0.034$, $p_c > 0.05$), OR 1.9 (1.42-2.56). KIR3DS1 presentó una frecuencia aumentada en pacientes (66.6%) frente a controles (31.5%) de forma significativa ($p = 0.035$, $p_c > 0.05$), OR 4.33 (1.23-15.20).

Seguidamente se analizaron los casos heterocigotos para C1 y C2 (C1C2), y en este caso se obtuvieron varios resultados significativos. La asociación con el haplotipo B fue altamente significativa ($p = 0.005$), OR 3.42 (1.47-7.97) para el grupo de pacientes. El haplotipo B01 centromérico también se asoció a enfermedad reumatoide ($p = 0.023$) OR 2.38 (1.18-4.82). KIR2DL2 estuvo presente en el 48% de los controles frente al 69% de los pacientes, lo que resultó significativo ($p = 0.014$, $pc > 0.05$), OR 2.38 (1.23-4.68). KIR2DS2 también presentó diferencias significativas a favor del grupo de pacientes ($p = 0.008$, $pc > 0.05$) OR 2.5 (1.30-4.92). KIR 2DS3 también presentó frecuencias mayores en pacientes sin alcanzar significación estadística.

A continuación, se analizaron los casos positivos para C1 (C1X), formado por la suma de casos C1C1 y C1C2. En este caso la asociación con el haplotipo KIR B ganó significación ($p = 0.002$) OR 2.65 (1.43-4.89), y también aumentaron las diferencias entre pacientes y controles respecto a la frecuencia de KIR2DS3, alcanzando significación ($p = 0.015$, $pc > 0.05$), OR 2.01 (1.17-3.45). El haplotipo B01 centromérico también resultó significativamente asociado a pacientes en este grupo ($p = 0.016$), OR 2.04 (1.16-3.58). (Tabla 14).

5.2. Ligandos KIR en base a dimorfismo en posición 77 y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 80 a 83 (Bw4, Bw6) frente a genes KIR y haplotipos KIR.

En primer lugar, se seleccionaron casos homocigotos para Bw4 comparando las frecuencias de haplotipos KIR y presencia de diferentes genes KIR entre pacientes y controles. Este análisis estadístico no arrojó diferencias significativas.

A continuación, se seleccionaron los casos homocigotos para Bw6 y en este caso sí se obtuvieron resultados significativos; KIR2DL3 resultó significativamente menos frecuente en pacientes ($p = 0.012$, $pc > 0.05$) OR .057 (0.0032-1.03), mientras que KIR2DS3 resultó más frecuente ($p = 0.019$, pc

>0.05) OR 3.36 (1.27-8.94). El haplotipo B01 centromérico resultó significativamente más frecuente en pacientes ($p = 0.006$), OR 4.84 (1.59-14.76).

Seguidamente se seleccionaron los casos para Bw4 en heterocigosis, obteniendo varios resultados significativos. KIR2DS3 resultó significativamente más frecuente en los pacientes ($p = 0.009$, $pc >0.05$) OR 2.24 (1.25-4.02), así como KIR3DS1 ($p = 0.021$, $pc >0.05$) OR 1.95 (1.14-3.35). KIR2DL5 también fue más frecuente en los pacientes ($p = 0.041$, $pc >0.05$) OR 1.87 (1.06-3.11) y el haplotipo Bx se asoció al grupo de pacientes ($p = 0.007$) OR 2.56 (1.33-4.93), al igual que el haplotipo B01 centromérico ($p = 0.034$) OR 2.00 (1.09-3.67).

Por último, se analizaron los casos heterocigotos para Bw6, en los que KIR2DL3 resultó menos frecuente en pacientes ($p = 0.041$, $pc >0.05$), OR 0.343 (0.13-0.91), mientras KIR2DS3 fue más frecuente en pacientes ($p = 0.011$, $pc >0.05$) OR 2.11 (1.20-3.70) y también KIR3DS1 ($p = 0.024$, $pc >0.05$) OR 1.86 (1.10-3.16). El haplotipo Bx también resultó significativamente más frecuente en los pacientes ($p = 0.003$) OR 2.53 (1.35-4.74) así como el haplotipo B01 centromérico ($p = 0.012$) OR 2.20 (1.21-3.99). (Tabla 14).

TABLA 14. ANÁLISIS MULTIVARIANTE CASO-CONTROL ENTRE LIGANDOS KIR, HAPLOTIPOS Y GENES KIR. SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (p valor).

Ligando KIR (N)	Haplotipo BX	Haplotipo cB01	KIR2DL3	KIR3DS1	KIR2DL2	KIR 2DS2	KIR2DS3	KIR2DL5
C1-C1 (96)	0.183	0,471	0.702	0.142	0.539	0.412	0.173	0.151
C2-C2 (46)	1,000	0.335	0.034§	0.035§	1.000	1.000	0,235	0.371
C1-C2 (154)	0.005	0.023	1.000	1.000	0.014§	0.008§	0.063	0.622
C1X (250)	0,002	0.016	0.680	0.204	0.127	0.126	0.015§	0.129
Bw4 homo (76)	0.225	0.213	1.000	0.364	0.345	0.345	0.087	0.647
Bw6 homo (85)	0.201	0.006	0.012§	0.195	0.388	0.193	0.019	0.274
Bw4 (218)	0.007	0.034	1.000	0.021§	0.413	0.411	0.009§	0.041§
Bw6 (227)	0.004	0.012	0.041§	0.024§	0.184	0.143	0.011§	0,061

Significación por debajo de 0.05. §: p valor corregido (pc) > 0.05. cB01: centromérico B 01

5.3 KIR2DS3, KIR3DS1 y KIR3DL5 frente a alelos HLA de clase I.

El estudio de los casos KIR2DS3 positivo con respecto a la frecuencia de alelos de HLA-C en casos y controles no arrojó resultados significativos. Sí que hubo asociación con HLA-A*24, presente en 11 pacientes y únicamente 1 control ($p = 0.024$, $pc >0.05$) OR 8.37 (1.03-67.92). En el estudio de correlación, KIR2DS3 correlacionó con HLA-C*06 en pacientes (Rho .174, $p = 0.033$) pero no en controles. Se estudiaron los casos KIR2DS3 y HLA-C*06 positivos, obteniendo 25 casos: 17 fueron pacientes y 8 controles, sin alcanzar estas diferencias significación estadística.

Los casos KIR3DS1 también se analizaron en el mismo sentido, sin obtener diferencias en cuanto a HLA-C entre pacientes y controles. Sí que resultaron diferentes las frecuencias de HLA-B*35 ($p = 0.045$, $pc >0.05$) OR 2.74 (1.01-7.42) y HLA-A*33 ($p = 0.011$, $pc >0.05$) OR 0.09 (0.01-0.71). En el estudio de correlación, KIR3DS1 correlacionó con ausencia de HLA-C*07 (Rho -0.204, $p = 0.021$) en pacientes, y con presencia de HLA-C*06 (Rho 0.221, $p = 0.007$) en controles.

La presencia de KIR2DL5 se asoció significativamente con una menor frecuencia de HLA-A*33 en pacientes ($p = 0.024$, $pc >0.05$) OR 0.17 (0.04-0.78). KIR2DL5 correlacionó con HLA-C*06 en controles (Rho 0.217, $p = 0.008$) pero no en pacientes.

5.4 Alelos de HLA de clase I con frecuencias significativamente diferentes entre pacientes y controles frente a genes y haplotipos y KIR.

El estudio de HLA-A*33, B*38 ni B*39 no arrojó diferencias significativas entre pacientes y controles respecto a su relación con las frecuencias de genes KIR ni haplotipos KIR.

5.5 Correlaciones o ligamientos entre genes KIR. Diferencias entre pacientes y controles en cuanto a ligandos KIR.

Se estudió la correlación entre KIR2DS3, KIR3DS1 y KIR2DL5, siendo positiva entre todos ellos. La más significativa ocurrió entre KIR2DL5 y KIR 3DS1 (Rho 0.766, $p < 0.001$), seguida por KIR2DL5 con KIR2DS3 (Rho 0.589, $p < 0.001$) y KIR2DS3 con KIR2DS1 (Rho 0.335, $p < 0.001$).

Este hallazgo sugiere un desequilibrio de ligamiento probablemente relacionado con el haplotipo KIR; en el estudio de correlación, efectivamente existe correlación entre el haplotipo B y haplotipo cB01; sobre todo KIR2DS3 (Rho 0.896, $p < 0.001$), KIR2DL5 (Rho 0.566, $p < 0.001$) y KIR3DS1 (Rho 0.284, $p < 0.001$) con el haplotipo KIR cB01. El haplotipo B correlacionó también con KIR2DL5 (Rho 0.622, $p < 0.001$), KIR3DS1 (Rho 0.526, $p < 0.001$) y KIR2DS3 (Rho 0.393, $p < 0.001$).

TABLA 15. CORRELACIÓN ENTRE HAPLOTIPO KIR Y GENES KIR

			KIR_Haplot_cod	KIR_cB01Hapl	KIR2DS3	KIR3DS1	KIR2DL5
Rho de Spearman	KIR_Haplot_cod	Coefficiente de correlación	1,000	,352**	,393**	,526**	,622**
		Sig. (bilateral)	.	,000	,000	,000	,000
		N	301	301	301	301	301
	KIR_cB01Hapl	Coefficiente de correlación	,352**	1,000	,896**	,284**	,566**
		Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,000	,000
		N	301	301	301	301	301
	KIR2DS3	Coefficiente de correlación	,393**	,896**	1,000	,335**	,589**
		Sig. (bilateral)	,000	,000	.	,000	,000
		N	301	301	301	301	301
	KIR3DS1	Coefficiente de correlación	,526**	,284**	,335**	1,000	,766**
		Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	.	,000
		N	301	301	301	301	301
	KIR2DL5	Coefficiente de correlación	,622**	,566**	,589**	,766**	1,000
		Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,000	.
		N	301	301	301	301	301

** : La correlación es significativa a nivel ,001 (bilateral).

KIR_Haplot_Cod: Haplotipo KIR Bx. KIR_cB01Hapl: Haplotipo KIR centromérico B01.

En el estudio de asociaciones entre haplotipo A o Bx y ligandos KIR (C1/C2/C1x, Bw4/Bw6 y alelos HLA-C) no se encontraron diferencias entre casos y controles.

Los haplotipos cB01, tB01, tA01 y cA01 no se asociaron a diferencias entre pacientes y controles respecto a ligandos KIR.

La ausencia de haplotipos cA01 y tA01 tampoco se asoció a diferencias entre casos y controles respecto a ligandos KIR.

Entre los pacientes con KIR2DL3 negativo (ausencia de haplotipo centromérico A) únicamente se encontró un valor medio significativamente menor de DAS28 ($p = 0.012$).

OBJETIVO 6: Analizar las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), alelos KIR, haplotipos KIR y ligandos KIR (C1/C2; Bw4/Bw6) en pacientes con AR respecto a variables cualitativas clínicas.

6.1 HLA-A.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en el HLA-A de los pacientes con AR respecto a las variables cualitativas clínicas estudiadas arrojó algunos resultados significativos.

El alelo HLA-A*24 mostró un efecto protector frente a la afectación ocular, con una frecuencia del 11.5% frente al 35% de aquellos que no presentaban este alelo ($p = 0.019$, $pc > 0.05$), OR 0.241 (0.068-0.853).

En el caso de HLA-A*26, positivo en 10 pacientes (8.3%), el 90% presentaba erosiones frente a la frecuencia global de erosiones del 56.7% en el grupo de pacientes con AR, lo que resultó estadísticamente significativo ($p = 0.043$, $pc > 0.05$), OR 6.95 (0.91-53.38).

El alelo HLA-A*29 fue positivo en 21 pacientes, en cuatro de ellos se observó vasculitis cutánea (20%), lo que resultó significativamente superior a la frecuencia de vasculitis observada (5.3%) en el global de pacientes con AR ($p = 0.005$, $pc > 0.05$), OR 11.33 (2.30-55.92).

El alelo HLA-A*39 solamente se observó en un paciente, que presentaba carditis y eventos cardiovasculares. La frecuencia por tanto era del 100 % en este paciente, lo que resultó significativamente diferente a la frecuencia observada en todos los pacientes ($p = 0.029$, $pc > 0.05$) para carditis.

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los alelos HLA-A estudiados para manifestaciones clínicas de los pacientes ni tampoco respecto a la afectación de la calidad de vida ni la actividad inflamatoria de la enfermedad.

**TABLA 16. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-A EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE
VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS**

HLA-A (N = 140)	NÓDULOS	OSTEOPOROSIS	OCULAR	SEROITIS	VASCULITIS	NEUMOPATÍA	CARDITIS	EVENTOS CV	EROSIONES	CALIDAD DE VIDA				ACTIVIDAD INFLAMATORIA			
										NORMAL	LEVE	MODERADA	SEVERA	REMISION	LEVE	MODERADA	SEVERA
A*01 (27)	3	5	6	1	0	2	1	2	15	11	9	4	3	4	7	13	3
A*02 (66)	7	20	24	2	2	6	1	4	28	22	23	13	8	8	11	37	10
A*03 (19)	6	5	3	0	1	4	1	2	8	5	7	4	3	3	0	12	4
A*11 (14)	2	2	6	2	1	1	0	2	6	7	6	1	0	3	1	7	3
A*23 (12)	1	6	3	1	0	1	0	1	2	5	3	3	1	0	1	3	8
A*24 (26)	6	6	3§	2	2	3	1	4	14	11	6	7	2	6	4	11	5
A*25 (4)	1	0	1	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0	0	0	2	2
A*26 (10)	2	3	5	1	0	1	0	0	9§	4	4	2	0	3	0	4	3
A*29 (18)	2	4	4	1	4§	1	1	1	10	5	5	5	3	4	1	10	3
A*30 (16)	2	2	4	0	1	2	1	2	10	7	5	3	1	2	4	7	3
A*31 (7)	1	2	2	0	0	1	0	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2
A*32 (7)	1	2	1	1	1	2	0	1	2	3	4	0	0	1	0	4	2
A*33 (3)	1	0	2	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0
A*34 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
A*39 (1)	1	0	1	0	0	0	1§	1§	0	0	0	0	1	0	0	0	1
A*66 (1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A*68 (16)	1	3	7	0	1	2	0	2	7	10	5	1	0	2	2	7	5
A*69 (1)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

§: p valor corregido (pc) > 0,05.

6.2 HLA-B.

El estudio de las diferentes variantes alélicas HLA-B de los 144 pacientes tipados con AR respecto a las variables cualitativas clínicas estudiadas arrojó algún resultado significativo. (Tabla 17)

En el caso de HLA-B *45, de los 5 pacientes positivos 2 (40%) presentaron vasculitis frente al 0.7% de los pacientes, lo que resultó significativo ($p = 0.006$, $pc > 0.05$), OR 54.40 (4.20-704.41).

**TABLA 17. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA- B EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE
VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS**

HLA-B (N = 144)	NÓDULOS	OSTEOPOROSIS	OCULAR	SEROITIS	VASCULITIS	NEUMOPATÍA	CARDITIS	EVENTOS CV	EROSIONES	CALIDAD DE VIDA				ACTIVIDAD INFLAMATORIA			
										NORMAL	LEVE	MODERADA	SEVERA	REMISION	LEVE	MODERADA	SEVERA
B*07 (24)	4	4	6	1	0	4	1	4	12	12	9	2	1	5	3	11	5
B*08 (23)	7	6	10	1	2	4	1	2	16	4	12	4	3	2	1	14	6
B*13 (4)	0	1	0	0	0	1	0	0	1	2	1	1	0	1	0	1	2
B*14 (16)	2	4	6	0	0	1	0	1	10	10	5	1	0	3	1	9	3
B*18 (18)	4	4	4	0	1	2	1	3	9	7	6	3	2	3	3	9	3
B*24 (1)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B*27 (8)	1	2	2	2	0	0	0	1	6	4	2	2	0	0	3	5	0
B*35 (26)	3	8	5	0	0	2	0	3	17	13	6	4	3	5	3	13	5
B*37 (5)	1	1	2	1	0	1	0	0	2	4	0	1	0	0	2	2	1
B*38 (2)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0
B*39 (11)	2	3	3	1	0	1	1	2	7	4	5	1	1	1	3	6	1
B*40 (15)	5	3	5	0	0	2	0	3	8	6	5	4	0	5	2	6	2
B*41 (3)	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	0	1	0	1	1
B*42 (1)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
B*44 (40)	4	13	12	3	4	5	1	2	24	17	11	8	4	7	5	17	11
B*45 (3)	0	0	1	0	2§	0	0	0	2	1	0	2	0	1	0	2	0
B*48 (1)	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
B*49 (16)	4	3	5	0	0	3	0	1	8	4	8	3	1	3	2	6	5
B*50 (8)	0	2	2	1	0	0	0	0	3	2	3	2	1	0	2	1	5
B*51 (15)	3	3	5	1	1	0	1	1	7	2	7	3	3	2	4	8	1
B*52 (4)	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	1	0	0	1	2	1	0
B*53 (4)	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	0	3	1	0
B*55 (3)	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
B*56 (2)	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	1	0
B*57 (6)	1	1	0	1	1	1	0	1	4	2	4	0	0	2	2	2	0
B*58 (1)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0

§: p valor corregido (pc) > 0,05

6.3 HLA-C.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en el HLA-C de los 150 pacientes tipados con AR respecto a las variables cualitativas clínicas estudiadas arrojó algunos resultados significativos.

El HLA-C*01 estuvo presente en 9 pacientes, dos de ellos (22%) presentaron serositis, con una incidencia significativamente superior a la frecuencia observada en el total de pacientes con artritis Reumatoide (4%), ($p = 0.042$, $pc > 0.05$), OR 9.85 (1.36-63.29).

HLA-C*03 fue positivo en 27 pacientes, de los que 13 (48.1%) presentaron afectación ocular, una incidencia significativamente superior al 31.1% observado en los pacientes con AR ($p = 0.041$, $pc > 0.05$), OR 2.46 (1.05-5.76).

En el caso de HLA-C*07, de los 74 pacientes portadores de este alelo, 17 (22.9%) presentaron nódulos reumatoides ($p = 0.049$, $pc > 0.05$), OR 2.57 (1.04-6.39); y 12 (16.2%) neumopatía ($p = 0.035$, $pc > 0.05$) OR 3.53 (1.08-11.51). Ambas incidencias resultaron significativamente superiores a las observadas en el total de pacientes con AR (16.6% y 9.9% respectivamente para nódulos reumatoides y neumopatía).

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los alelos estudiados del HLA-C para manifestaciones clínicas de los pacientes ni tampoco respecto a la afectación de la calidad de vida ni la actividad inflamatoria de la enfermedad. (Tabla 18).

**TABLA 18. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA- C EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE
VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS**

HLA-C (N = 150)	NÓDULOS	OSTEOPOROSIS	OCULAR	SEROITIS	VASCULITIS	NEUMOPATÍA	CARDITIS	EVENTOS CV	EROSIONES	CALIDAD DE VIDA				ACTIVIDAD INFLAMATORIA			
										NORMAL	LEVE	MODERADA	SEVERA	REMISION	LEVE	MODERADA	SEVERA
C*01 (9)	0	2	3	2§	1	0	0	0	5	4	3	1	1	1	2	6	0
C*02 (13)	4	4	2	0	1	3	1	2	9	3	6	6	1	2	2	8	1
C*03 (27)	5	4	13§	0	1	2	0	2	15	12	7	6	2	8	3	11	5
C*04 (35)	2	11	9	1	0	2	0	4	21	16	9	6	4	5	5	17	8
C*05 (31)	4	7	9	0	1	4	1	1	15	15	9	5	2	7	3	14	7
C*06 (29)	2	4	8	2	1	1	0	1	12	13	8	7	1	6	6	8	9
C*07 (74)	17§	20	24	4	4	12§	4	9	45	24	30	13	7	10	8	39	17
C*08 (16)	3	6	8	0	0	1	0	1	11	8	6	2	0	3	1	10	2
C*12 (16)	5	3	4	0	0	1	1	2	8	8	5	2	1	1	5	6	4
C*14 (5)	0	1	1	1	0	2	0	0	2	3	1	0	1	1	1	2	1
C*15 (10)	2	0	2	0	0	1	0	1	4	1	6	2	1	1	2	5	2
C*1601 (16)	3	4	5	2	4	1	2§	2	9	5	4	3	4	3	4	6	3
C*1602 (1)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
C*1635 (2)	0	2	1	0	1	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	2	0
C*17 (4)	0	2	1	0	0	0	0	1	4	1	1	2	0	0	0	3	1

§: p valor corregido (pc) > 0,05

6.4 LIGANDOS DE KIR Y HAPLOTIPOS KIR.

El estudio de las diferentes variantes de ligandos KIR y haplotipos KIR en los pacientes con AR respecto a las variables cualitativas clínicas estudiadas (Tabla 19), arrojó algún resultado significativo.

En el caso de los pacientes homocigotos para el ligando Bw4 se observó una incidencia de serositis del 10.8%, lo que resultó significativamente superior al 4% observado en la cohorte de pacientes ($p = 0.032$), OR 6.79 (1.19-38.72).

En el caso de los pacientes homocigotos para el ligando Bw6 se observó una incidencia de eventos cardiovasculares del 18.6%, significativamente superior al 9.3% observado en los pacientes ($p = 0.025$), OR 3.89 (1.26-11.98).

El haplotipo B01 centromérico se asoció a una menor proporción de nódulos reumatoideos en el 7.4% de los pacientes ($p = 0.024$) OR 0.29 (0.09-0.89).

TABLA 19. LIGANDOS KIR. VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS

LIGANDOS KIR (N = 144)	NÓDULOS	OSTEOPOROSIS	OCULAR	SEROITIS	VASCULITIS	NEUMOPATÍA	CARDITIS	EVENTOS CV	EROSIONES	CALIDAD DE VIDA				ACTIVIDAD INFLAMATORIA			
										NORMAL	LEVE	MODERADA	SEVERA	REMISION	LEVE	MODERADA	SEVERA
C1-C1 (45)	12	11	17	3	5	6	1	6	26	16	17	8	4	7	7	24	7
C1-C2 (77)	11	20	23	3	1	9	4	5	45	32	24	13	8	13	10	36	18
C2-C2 (27)	2	5	6	0	2	1	0	3	13	10	9	7	1	6	4	11	6
Bw4 (109)	17	27	31	6	6	11	3	8	60	46	33	21	9	18	18	50	23
Bw4-Bw4 (37)	6	9	10	4 [†]	2	5	1	2	24	17	10	6	4	5	9	13	10
Bw6 (114)	19	30	34	4	5	12	3	13	64	47	40	18	9	20	15	56	23
Bw6-Bw6 (43)	10	8	13	0	0	5	2	8 [†]	24	17	4	8	4	9	5	19	10
HAPLOTIPOS KIR																	
AA (24)	2	6	5	1	3	3	0	2	12	8	8	4	4	2	4	10	8
BX (127)	23	31	42	5	5	13	5	12	73	50	43	24	10	24	18	62	23
cB01 (54)	4 [†]	15	16	3	1	5	1	6	26	20	21	10	3	11	11	23	9

cB01: centromérico B01. 4[†]: p valor = 0.032, 8[†]: p valor = 0.025, 4[†]: p valor = 0.024.

6.5 KIR.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en los genes KIR de los 151 pacientes con AR respecto a las variables cualitativas clínicas estudiadas arrojó algunos resultados significativos en varios casos (Tabla 20).

KIR2DL2 estuvo presente en 94 individuos (62%) y respecto a la actividad inflamatoria, presentó una tasa de pacientes en alta actividad del 13%, significativamente menor que el 20.5% observado en el total de pacientes ($p = 0.003$, $pc > 0.033$), OR 0.30 (0.13-0.69).

KIR2DS3, positivo en 62 pacientes, se asoció con una menor incidencia de nódulos reumatoides, presentes en el 8% de ellos frente al 16.6 % del total de AR ($p = 0.025$, $pc > 0.05$), OR 0.30 (0.11-0.86).

KIR3DS1, positivo en 81 pacientes, se asoció significativamente a una mayor proporción de pacientes en remisión en el momento de su inclusión en el estudio, con un 24.6% frente al 17.2% de la cohorte de pacientes ($p = 0.008$, $pc > 0.05$), OR 3.50 (1.32-9.29) y una menor proporción de pacientes con actividad moderada ($p = 0.0016$, $pc > 0.019$) OR 0.29 (0.15-0.56).

KIR2DS5, positivo en 53 pacientes, se asoció con una mayor incidencia de nódulos reumatoides (28.3%), con 15 pacientes ($p = 0.006$, $pc > 0.05$), OR 3.47 (1.43-8.43).

En los 144 pacientes positivos para KIR 2DP1 (95%), la incidencia de nódulos reumatoides fue del 15.2%, significativamente inferior a la observada en el total de pacientes (16.6%) ($p = 0.032$, $pc > 0.05$), OR 0.12 (0.02-0.75).

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los genes KIR estudiados para manifestaciones clínicas de los pacientes ni tampoco respecto a la afectación de la calidad de vida ni la actividad inflamatoria de la enfermedad.

**TABLA 20. FRECUENCIAS GENES KIR EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE
VARIABLES CLÍNICAS CUALITATIVAS**

KIR (N = 151)	NÓDULOS	OSTEOPOROSIS	OCULAR	SEROITIS	VASCULITIS	NEUMOPATÍA	CARDITIS	EVENTOS CV	EROSIONES	CALIDAD DE VIDA				ACTIVIDAD INFLAMATORIA			
										NORMAL	LEVE	MODERADA	SEVERA	REMISION	LEVE	MODERADA	SEVERA
KIR 2DL1 (140)	22	34	44	6	8	15	5	12	79	55	45	27	13	24	20	67	29
KIR 2DL2 (93)	11	24	32	5	4	7	2	7	51	34	35	17	7	18	15	48	12£
KIR 2DL3 (131)	20	32	41	6	8	14	5	10	74	50	41	27	13	20	18	64	29
KIR 2DL5 (92)	16	26	29	4	2	12	3	10	50	38	29	20	5	20	15	38	19
KIR 3DL1 (145)	23	37	46	5	8	14	5	14	82	55	49	27	14	23	22	69	31
KIR 2DS1 (73)	16	21	21	3	1	9	3	7	42	32	20	16	5	17	13	29	14
KIR 2DS2 (94)	12	25	31	5	4	8	2	8	52	35	36	16	7	18	15	47	14
KIR 2DS3 (62)	5§	17	20	3	1	5	1	6	30	24	25	10	3	12	13	25	12
KIR 2DS4 (144)	22	37	46	5	8	14	5	14	81	55	48	27	14	23	22	69	30
KIR 2DS5 (53)	15§	14	14	3	2	7	3	6	32	23	12	14	4	13	8	23	9
KIR 3DS1 (81)	17	21	24	3	2	9	4	9	46	36	22	17	6	20§	14	29¥	18
KIR 2DP1 (146)	22§	35	46	6	8	15	5	14	82	57	48	28	13	25	21	70	30

§: p valor corregido (pc) > 0,05; ¥: pc = 0.019, razón de probabilidades (OR): 0.29 (0.15-0.56).
£: pc = 0.033, OR: 0.30 (0.13-0.69).

OBJETIVO 7. Análisis de asociación entre variables cualitativas de laboratorio en pacientes y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos, ligandos KIR, haplotipos KIR y genes KIR.

7.1 HLA-A.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en el HLA-A de los pacientes con AR respecto a las variables cualitativas analíticas estudiadas (Tabla 21), mostró algunos resultados significativos.

El alelo A*03, presente en 19 pacientes, se asoció significativamente a positividad de FR o ACPA ($p = 0.0013$, $pc = 0.023$), OR 4.73 (1.73-12.98), no

habiendo ningún paciente negativo para ambas determinaciones que portase este alelo.

El alelo A*23, presente en 12 pacientes, se asoció significativamente a positividad de FR o ACPA ($p = 0.003$, $pc > 0.05$), OR 5.49 (1.61-18.71).

El alelo A*30, presente en 16 pacientes, se asoció a una menor tasa de positividad para ACPA ($p = 0.041$, $pc > 0.05$), OR 0.31 (0.11-0.86).

TABLA 21. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-A. VARIABLES CUALITATIVAS DE LABORATORIO

HLA-A (N = 140)	FACTOR REUMATOIDE//ACPA							ANA		ANOES					ENAS							
	F. REUMATOIDE -	F. REUMATOIDE +	ACPA -	ACPA +	AMBOS -	ALGUN +	AMBOS +	≤1/160	>1/160	NEGATIVO	C.PARIETAL	MITOCOND	M. LISO	DNA IgM	DNA IgG	NEGATIVO	POSITIVO	ANTI-Ro	CENTROMERO	UIRNP	HISTONA	RNP70
A*01 (27)	11	16	10	17	9	3	15	16	11	17	3	1	0	6	0	25	2	0	0	0	0	1
A*02 (66)	29	37	19	47	18	12	36	40	26	44	6	2	2	1 3	0	62	4	1	1	1	0	0
A*03 (19)	6	13	4	15	0	10‡	9	14	5	17	0	0	0	2	0	18	1	1	0	0	0	0
A*11 (14)	6	8	5	9	5	1	8	6	8	7	2	0	0	5	0	13	1	1	0	0	0	0
A*23 (12)	9	3	2	10	2	7‡	3	7	5	7	2	0	0	2	1	10	2	0	0	0	2	0
A*24 (26)	12	14	7	19	7	6	13	16	10	19	2	1	0	4	0	25	1	0	0	0	0	0
A*25 (4)	2	2	0	4	0	2	2	4	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
A*26 (10)	5	5	2	8	2	4	4	7	3	5	0	1	1	3	0	8	2	1	0	1	1	1
A*29 (18)	9	9	6	12	4	7	7	8	10	9	4	2	1	3	0	17	1	0	0	1	0	0
A*30 (16)	8	8	9‡	7‡	7	3	6	10	6	13	0	0	0	3	0	16	0	0	0	0	0	0
A*31 (7)	5	2	2	5	2	3	2	4	3	4	1	0	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0
A*32 (7)	2	5	2	5	2	0	5	3	4	5	0	0	0	2	0	7	0	0	0	0	0	0
A*33 (3)	2	1	2	1	2	0	1	1	2	2	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
A*34 (1)	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A*39 (1)	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A*66 (1)	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
A*68 (16)	5	11	4	12	4	1	11	9	7	12	1	0	0	3	0	16	0	0	0	0	0	0
A*69	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

‡: p valor corregido (pc) > 0,05. †: $pc = 0.023$, Razón de probabilidades (OR): 4.73 (1.73-12.98).

ACPA: Anticuerpos anti péptido citrulinado; ANA: Anticuerpos Antinucleares; ANOES: Anticuerpos no órgano específicos; ENAS: Anticuerpos extraíbles del núcleo. MITOCOND: Antimitocondriales, M. LISO: Anti músculo liso.

7.2 HLA-B.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en el HLA-B de los pacientes con Artritis Reumatoide respecto a las variables cualitativas analíticas estudiadas arrojó algunos resultados significativos (Tabla 22):

TABLA 22. FRECUENCIAS ALELICAS HLA-B. VARIABLES CUALITATIVAS DE LABORATORIO

HLA-B (N = 144)	FACTOR REUMATOIDE//ACPA						ANA		ANOES					ENAS								
	F. REUMATOIDE -	F. REUMATOIDE +	ACPA -	ACPA +	AMBOS -	ALGUN +	AMBOS +	≤1/160	>1/160	NEGATIVO	C.PARIETAL	MITOCOND	M. LISO	DNA IgM	DNA IgG	NEGATIVO	POSITIVO	ANTI-RO	CENTROMERO	UIRNP	HISTONA	RNP70
B*07 (24)	13	11	9	15	8	6	10	14	10	20	1	0	0	3	0	22	1	0	0	0	1	0
B*08 (23)	10	13	8	15	6	6	11	14	9	18	1	0	1	2	1	22	1	1	0	1	0	1
B*13 (4)	2	2	1	3	1	1	2	4	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
B*14 (16)	9	7	7	9	8	1	7	8	8	10	2	0	0	4	0	16	0	0	0	0	0	0
B*18 (18)	8	10	7	11	5	5	8	8	10	13	1	2	1	2	0	17	1	0	0	1	0	0
B*24 (1)	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B*27 (8)	3	5	3	5	3	0	5	5	3	7	0	0	0	1	0	8	0	0	0	0	0	0
B*35 (26)	15	11	10	16	9	7	10	17	9	19	0	0	0	7	0	25	1	1	0	0	0	0
B*37 (5)	3	2	2	3	3	1	2	2	3	2	1	0	0	2	0	5	0	0	0	0	0	0
B*38 (2)	0	0	1	1	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
B*39 (11)	3	8	2	9	2	1	8	6	5	9	0	0	0	2	0	10	1	1	0	0	0	0
B*40 (15)	6	9	3	12	3	3	9	8	7	11	2	1	1	1	0	14	1	0	0	0	0	0
B*41 (3)	3	0	1	2	1	2	0	2	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
B*42 (1)	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B*44 (40)	20	20	8	32	8	13	19	19	21	23	6	2	1	8	1	38	2	0	0	0	1	1
B*45 (3)	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
B*48 (1)	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B*49 (16)	7	9	1§	15§	1	6	9	10	6	7	2	0	0	7	0	15	1	0	1	0	0	0
B*50 (8)	4	4	3	5	3	1	4	5	3	4	1	0	0	3	0	7	1	0	0	0	1	0
B*51 (15)	7	8	9	6	7	2	6	12	3	13	1	0	0	1	0	14	1	0	0	0	0	1
B*52 (4)	1	3	0	4	0	1	3	3	1	1	0	0	0	3	0	3	1	0	1	0	0	0
B*53 (4)	1	3	1	3	1	0	3	3	1	2	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
B*55 (3)	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	0	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0
B*56 (2)	0	2	0	2	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
B*57 (6)	1	5	1	5	0	2	4	5	1	3	1	0	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0
B*58 (1)	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

§: p valor corregido (pc) > 0,05.

ACPA: Anticuerpos anti péptido citrulinado; ANA: Anticuerpos Antinucleares; ANOES: Anticuerpos no órgano específicos; ENAS: Anticuerpos extraíbles del núcleo. MITOCOND: Antimitocondriales, M. LISO: Anti músculo liso.

El alelo B*49 se asoció con una mayor tasa de positividad para ACPA ($p = 0.022$, $p < 0.05$), OR 7.86 (1-01-69.45); positivos en 15 de los 16 pacientes con este alelo (93.7%).

7.3 HLA-C.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en el HLA-C de los pacientes con AR respecto a las variables cualitativas analíticas estudiadas no presentó diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 23)

TABLA 23. FRECUENCIAS ALELICAS HLA-C. VARIABLES CUALITATIVAS DE LABORATORIO

HLA-C (N = 151)	FACTOR REUMATOIDE//ACPA							ANA		ANOES						ENAS						
	F. REUMATOIDE -	F. REUMATOIDE +	ACPA -	ACPA +	AMBOS -	ALGUN +	AMBOS +	≤1/160	>1/160	NEGATIVO	C.PARIETAL	MITOCOND	M. LISO	DNA IgM	DNA IgG	NEGATIVO	POSITIVO	ANTI-RO	CENTROMERO	UIRNP	HISTONA	RNP70
C*01 (9)	2	7	3	6	2	1	6	7	2	8	0	0	0	1	0	8	1	1	0	0	0	0
C*02 (13)	6	7	5	8	5	1	7	7	6	10	1	0	0	2	0	13	0	0	0	0	0	0
C*03 (27)	9	18	5	22	5	4	18	15	12	17	2	3	2	5	0	24	3	1	0	0	0	0
C*04 (35)	19	16	10	25	9	11	15	22	13	23	3	0	0	9	0	33	2	1	0	0	1	0
C*05 (31)	15	16	12	19	9	10	12	18	13	22	3	1	1	5	0	30	1	1	0	1	0	1
C*06 (29)	15	14	10	19	9	7	13	17	12	15	4	0	1	9	0	27	2	0	1	0	1	0
C*07 (74)	32	42	23	51	18	19	37	41	33	52	7	2	1	12	0	67	7	2	1	2	1	1
C*08 (16)	8	8	6	10	7	1	8	7	9	11	1	0	0	4	0	15	1	0	0	0	0	0
C*12 (16)	5	11	2	14	2	3	11	10	6	11	1	0	0	4	0	14	2	0	2	0	0	0
C*14 (5)	3	2	2	3	2	1	2	4	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
C*15 (10)	6	4	5	5	5	1	4	9	1	8	1	0	0	1	0	10	0	0	0	0	0	0
C*1601 (16)	5	11	3	13	2	4	10	6	7	10	2	2	1	1	1	15	1	0	0	1	0	0
C*1602 (1)	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
C*1635 (2)	2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
C*17 (4)	3	1	1	3	1	2	1	2	2	2	1	0	0	1	0	3	1	0	0	0	1	0

ACPA: Anticuerpos anti péptido citrulinado; ANA: Anticuerpos Antinucleares; ANOES: Anticuerpos no órgano específicos; ENAS: Anticuerpos extraíbles del núcleo. MITOCOND: Antimitocondriales, M. LISO: Anti músculo liso.

7.4 LIGANDOS Y HAPLOTIPOS KIR.

El estudio de las diferentes variantes observadas en los ligandos y haplotipos KIR de los pacientes con AR respecto a las variables cualitativas analíticas estudiadas mostró algunos resultados estadísticamente significativos (Tabla 24).

La presencia de haplotipo cB01 se asoció con una menor tasa de positividad para FR ($p = 0.017$) OR 0.42 (0.22-0.84) y con una menor tasa de doble positividad para ACPA y FR ($p = 0.008$) OR 0.40 (0.20-0.80).

TABLA 24. LIGANDOS Y HAPLOTIPOS KIR. VARIABLES CUALITATIVAS DE LABORATORIO																						
	FACTOR REUMATOIDE//ACPA							ANA		ANOES						ENAS						
	F. REUMATOIDE -	F. REUMATOIDE +	ACPA -	ACPA +	AMBOS -	ALGUN +	AMBOS +	≤1/160	>1/160	NEGATIVO	C.PARIETAL	MITOCOND	M. LISO	DNA IgM	DNA IgG	NEGATIVO	POSITIVO	ANTI-Ro	CENTROMERO	ULRNP	HISTONA	RNP70
LIGANDOS KIR (N= 144)																						
C1-C1 (45)	16	29	12	33	10	8	27	21	24	34	2	3	1	5	1	39	6	1	1	1	0	0
C1-C2 (77)	35	42	21	56	19	19	39	53	24	50	9	1	2	17	0	73	4	2	1	1	1	1
C2-C2 (27)	16	11	12	15	10	8	9	14	13	18	3	0	0	6	0	26	1	0	0	0	1	0
Bw4 (109)	52	57	31	78	28	28	53	67	42	74	9	3	1	22	1	103	6	1	1	2	2	1
Bw4-Bw4 (37)	17	20	8	29	8	10	19	23	14	19	6	0	0	11	1	35	2	0	1	0	1	0
Bw6 (114)	55	59	38	76	33	28	53	67	47	83	6	4	3	19	1	106	8	3	0	2	2	1
Bw6-Bw6 (43)	22	21	17	26	15	9	19	21	22	32	2	1	2	7	0	42	1	0	0	0	1	0
HAPLOTIPOS KIR (N = 151)																						
AA (24)	11	13	10	14	8	5	11	16	8	20	2	1	0	1	0	23	1	0	0	0	0	0
BX (127)	58	69	36	91	32	31	64	73	54	83	1/2	3	3	28	1	117	9	3	2	2	2	1
B01c (54)	32	22	21	33	18	17	19	32	22	33	6	1	0	12	0	47	0	1	2	1	1	1

E: $p < 0.017$, razón de probabilidad (OR) 0.42 (0.22-0.84). Y: $p < 0.008$, OR 0.40 (0.20-0.80).
 ACPA: Anticuerpos anti péptido citrulinado; ANA: Anticuerpos Antinucleares; ANOES: Anticuerpos no órgano específicos; ENAS: Anticuerpos extraíbles del núcleo. MITOCOND: Antimitocondriales, M. LISO: Anti músculo liso.

7.5 KIR.

El estudio de las diferentes variantes alélicas observadas en los genes KIR de los pacientes con Artritis Reumatoide respecto a las variables cualitativas analíticas estudiadas no arrojó resultados estadísticamente significativos

TABLA 25. FRECUENCIA DE GENES KIR. VARIABLES CUALITATIVAS DE LABORATORIO																						
KIR (N = 151)	FACTOR REUMATOIDE//ACPA						ANA		ANOES						ENAS							
	F. REUMATOIDE -	F. REUMATOIDE +	ACPA -	ACPA +	AMBOS -	AMBOS +	≤1/160	>1/160	NEGATIVO	C.PARIETAL	MITOCOND	M. LISO	DNA IgM	DNA IgG	NEGATIVO	POSITIVO	ANTI-RO	CENTROMERO	UIRNP	HISTONA	RNP70	
KIR 2DL1 (140)	63	67	42	98	36	34	70	83	57	98	13	4	2	25	1	130	20	3	2	2	2	1
KIR 2DL2 (93)	45	48	28	65	26	22	45	53	40	60	9	3	3	21	0	83	10	3	2	2	2	1
KIR 2DL3 (131)	59	72	39	92	34	31	66	78	53	93	12	3	2	23	1	122	9	3	2	1	2	1
KIR 2DL5 (92)	48	44	31	61	26	27	39	52	40	61	9	3	2	19	1	83	9	2	2	2	2	1
KIR 3DL1 (145)	65	80	44	101	38	34	73	84	61	97	14	4	3	29	1	134	11	3	2	2	2	1
KIR 2DS1 (73)	38	35	23	50	20	21	32	41	32	50	6	3	2	14	1	66	7	1	2	2	2	1
KIR 2DS2 (94)	46	48	29	65	27	22	45	54	40	60	9	3	3	22	0	84	10	3	2	2	2	1
KIR 2DS3 (62)	35	27	23	39	19	20	23	35	27	37	7	2	1	16	1	55	7	2	2	2	1	1
KIR 2DS4 (144)	64	80	44	100	38	33	73	84	60	97	14	4	3	29	0	133	11	3	2	2	2	1
KIR 2DS5 (53)	27	26	19	34	17	12	24	30	23	38	3	2	1	9	1	49	4	1	0	2	1	1
KIR 3DS1 (81)	42	39	26	55	22	24	35	48	33	53	8	3	2	17	1	73	8	1	2	2	2	1
KIR 2DP1 (146)	66	80	44	102	38	35	73	86	60	100	14	4	2	28	1	136	10	3	2	2	2	1

ACPA: Anticuerpos anti péptido citrulinado; ANA: Anticuerpos Antinucleares; ANOES: Anticuerpos no órgano específicos; ENAS: Anticuerpos extraíbles del núcleo. MITOCOND: Antimitocondriales, M. LISO: Anti músculo liso.

OBJETIVO 8. Análisis de asociación entre variables cualitativas de tratamiento en pacientes y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos (A, B y C), ligandos KIR, genes y haplotipos KIR.

8.1 HLA-A.

El estudio de la frecuencia de utilización de corticoide, metotrexato, inmunosupresor, biológico, número de FAME utilizados y número de biológicos utilizados no mostró diferencias estadísticamente significativas para los distintos alelos de HLA-A.

TABLA 26. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-A. VARIABLES CUALITATIVAS DE TRATAMIENTO

HLA-A	Cortic		Metot		FAME		Biolog		Número FAME			Número de Biolog				
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	1	2	3	1	2	3	4	5
A*01 (27)	18	9	14	13	19	8	26	1	19	0	0	22	4	0	0	0
A*02 (66)	38	28	44	22	53	13	57	9	49	3	1	43	9	4	0	1
A*03 (19)	8	11	12	7	17	2	18	1	16	0	1	11	4	0	2	1
A*11 (14)	6	8	7	7	11	3	13	1	11	0	0	11	1	0	1	0
A*23 (12)	8	4	10	2	12	0	12	0	11	1	0	12	0	0	0	0
A*24 (26)	10	16	20	6	21	5	23	3	20	0	1	17	3	3	0	0
A*25 (4)	3	1	3	1	3	1	3	1	3	0	0	1	0	0	1	1
A*26 (10)	6	4	7	3	9	1	10	0	9	0	0	9	0	0	1	0
A*29 (18)	10	8	13	5	14	4	15	3	12	1	1	11	2	2	0	0
A*30 (16)	11	5	8	8	10	6	15	1	10	0	0	12	3	0	0	0
A*31 (7)	7	0	3	4	5	2	7	0	5	0	0	5	0	1	0	1
A*32 (7)	3	4	3	4	3	4	6	1	4	0	0	5	0	1	0	0
A*33 (3)	2	1	1	2	2	1	3	0	2	0	0	2	1	0	0	0
A*34 (1)	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A*39 (1)	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A*66 (1)	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
A*68 (16)	13	3	11	5	12	4	13	3	12	0	0	12	0	0	1	0
A*69 (1)	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0

Cortic: corticosteroides; Metot: Metotrexato; FAME: Fármacos modificadores de la enfermedad; Biolog: fármacos biológicos; Número FAME: número de FAME en tratamiento combinado; Número Biolog: número de agentes biológicos en la historia del paciente.

8.2 HLA-B.

En el estudio de la frecuencia de utilización de corticoide, metotrexato, inmunosupresor, biológico, número de FAME utilizados y número de biológicos utilizados para los distintos alelos de HLA-B sí aparecieron algunas diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 27. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-A. VARIABLES CUALITATIVAS DE TRATAMIENTO

HLA-B	Cortic		Metot		FAME		Biolog		Número FAME			Número de Biolog				
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	1	2	3	1	2	3	4	5
B*07 (24)	8§	16§	11	13	16	8	19	5	15	1	0	12	6	0	1	0
B*08 (23)	18§	5§	18	5	21	2	22	1	20	1	0	19	1	0	0	1
B*13 (4)	3	1	1	3	1§	3§	4	0	1	0	0	4	0	0	0	0
B*14 (16)	5§	11§	6	10	10	6	13	3	10	0	0	12	1	0	0	0
B*18 (18)	13	5	13	5	15	3	15	3	13	2	0	12	2	0	0	1
B*24 (1)	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B*27 (8)	6	2	6	2	7	1	7	1	6	1	0	4	2	1	0	0
B*35 (26)	11	15	15	11	22	4	24	2	22	0	0	19	0	1	3	1
B*37 (5)	5	0	2	3	3	2	5	0	3	0	0	3	2	0	0	0
B*38 (2)	1	1	1	1	2	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
B*39 (11)	3	8	6	5	6	5	10	1	6	0	0	7	1	2	0	0
B*40 (15)	9	6	9	6	13	2	14	1	13	0	0	10	2	2	0	0
B*41 (3)	2	1	2	1	3	0	2	1	3	0	0	2	0	0	0	0
B*42 (1)	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
B*44 (40)	21	19	25	15	32	8	37	3	30	1	1	30	2	3	2	0
B*45 (3)	2	1	2	1	3	0	3	0	3	0	0	2	1	0	0	0
B*48 (1)	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
B*49 (16)	8	8	11	5	12	4	16	0	11	0	1	11	5	0	0	0
B*50 (8)	5	3	6	2	7	1	7	1	3	0	1	5	2	0	0	0
B*51 (15)	11	4	11	4	13	2	14	1	12	1	0	11	2	1	0	0
B*52 (4)	3	1	1	3	2	2	4	0	2	0	0	4	0	0	0	0
B*53 (4)	3	1	2	2	2	2	4	0	2	0	0	4	0	0	0	0
B*55 (3)	1	2	3	0	3	0	2	1	3	0	0	2	0	0	0	0
B*56 (2)	0	2	2	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
B*57 (6)	3	3	3	3	4	2	5	1	3	0	1	4	0	1	0	0
B*58 (1)	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0

§: p valor corregido (pc) > 0,05. Cortic: corticoesteroides; Metot: Metotrexato; FAME: Fármacos modificadores de la enfermedad; Biolog: fármacos biológicos; Número FAME: número de FAME en tratamiento combinado; Número Biolog: número de agentes biológicos en la historia del paciente.

HLA-B*07 ($p = 0.013$, $pc > 0.05$), OR 0.31 (0.12-0.78) y HLA-B*14 ($p = 0.034$, $pc > 0.05$), OR 0,3 (0.1-0.92) se asociaron significativamente a una menor utilización de corticoide en el momento del estudio. Por el contrario, HLA-B*08 se asoció con un mayor requerimiento de corticoide ($p = 0.037$, $pc > 0.05$), OR 3.2 (1.11-9.19).

Por último, HLA-B*13 se asoció a una menor tasa de utilización de FAME ($p = 0.031$, $pc > 0.05$), OR 0.08 (0.01-0.83).

8.3 HLA-C.

El estudio de la frecuencia de utilización de corticoide, metotrexato, inmunosupresor, biológico, número de FAME utilizados y número de biológicos utilizados para los distintos alelos de HLA-C presentó algunas diferencias estadísticamente significativas.

HLA-C*06 se asoció con una menor tasa de uso de FAME ($p = 0.022$, $pc > 0.05$), OR 0.34 (0.14- 0.82) y HLA-C*04 a un mayor número de pacientes que precisaron un cuarto biológico ($p = 0.047$, $pc > 0.05$).

TABLA 28. FRECUENCIAS ALÉLICAS HLA-C. VARIABLES CUALITATIVAS DE TRATAMIENTO

HLA-C	Cortic		Metot		FAME		Biolog		Número FAME			Número de Biolog				
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	1	2	3	1	2	3	4	5
C*01 (9)	4	5	7	2	8	1	6	3	7	1	0	5	1	0	0	0
C*02 (13)	7	6	9	4	11	2	13	0	9	2	0	9	1	2	1	0
C*03 (27)	16	11	19	8	24	3	25	2	24	0	0	15	5	2	2	1
C*04 (35)	17	18	21	14	29	6	33	2	29	0	0	27	0	2	3§	1
C*05 (31)	18	13	18	13	25	6	27	4	25	0	0	20	4	1	1	1
C*06 (29)	18	11	13	16	18§	11§	28	1	17	0	1	23	5	0	0	0
C*07 (74)	41	33	48	26	61	13	64	10	56	3	2	49	12	2	0	1
C*08 (16)	5	11	6	10	10	6	13	3	10	0	0	10	2	1	0	0
C*12 (16)	10	6	10	6	13	3	13	3	12	1	0	12	0	0	1	0
C*14 (5)	2	3	3	2	3	2	4	1	3	0	0	3	1	0	0	0
C*15 (10)	7	3	5	5	7	3	10	0	6	1	0	6	3	0	1	0
C*1601 (16)	12	4	5	11	13	3	14	2	10	2	1	10	1	2	1	0
C*1602 (1)	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
C*1635 (2)	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0	1	0	1	0	0
C*17 (4)	3	1	3	1	4	0	3	1	4	0	0	3	0	0	0	0

§: p valor corregido ($pc > 0,05$). Cortic: corticoesteroides; Metot: Metotrexato; FAME: Fármacos modificadores de la enfermedad; Biolog: fármacos biológicos; Número FAME: número de FAME en tratamiento combinado; Número Biolog: número de agentes biológicos en la historia del paciente.

8.4 LIGANDOS Y HAPLOTIPOS KIR.

El análisis de la frecuencia de utilización de corticoide, metotrexato, inmunosupresor, biológico, número de FAME utilizados y número de biológicos utilizados para los distintos ligandos KIR y haplotipos KIR, no arrojaron diferencias significativas.

TABLA 29. LIGANDOS KIR Y HAPLOTIPOS KIR. VARIABLES CUALITATIVAS DE TRATAMIENTO

	Cortic		Metot		FAME		Biolog		Número FAME			Número de Biolog				
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	1	2	3	1	2	3	4	5
LIGANDOS KIR																
C1-C1 (45)	24	21	30	15	36	9	36	9	33	2	1	27	5	3	1	0
C1-C2 (77)	43	34	43	45	32	15	70	7	58	3	1	52	12	2	2	2
C2-C2 (27)	16	11	16	15	12	8	26	1	19	0	0	21	1	2	2	0
Bw4 (109)	62	47	69	40	83	26	100	9	79	2	2	77	14	6	2	1
Bw4-Bw4 (37)	23	14	25	12	28	9	34	3	26	1	1	28	3	2	1	0
Bw6 (114)	62	52	71	43	93	21	100	14	89	3	1	76	14	4	4	2
Bw6-Bw6 (43)	20	23	24	19	33	10	35	8	31	2	0	28	3	2	1	1
HAPLOTIPOS KIR																
AA (24)	17	7	14	10	17	7	21	3	14	1	2	15	3	1	0	2
BX (127)	67	60	78	49	102	25	113	14	98	4	0	86	15	7	5	0
B01c (54)	29	25	29	25	39	15	47	7	36	3	0	34	8	4	1	0

Cortic: corticoesteroides; Metot: Metotrexato; FAME: Fármacos modificadores de la enfermedad; Biolog: fármacos biológicos; Número FAME: número de FAME en tratamiento combinado; Número Biolog: número de agentes biológicos en la historia del paciente.

8.5 GENES KIR.

El estudio de la frecuencia de utilización de corticoide, metotrexato, inmunosupresor, biológico, número de FAME utilizados y número de biológicos utilizados para los distintos genes KIR arrojaron algunas diferencias estadísticamente significativas.

KIR 3DL1 ($p = 0.019$, $pc > .05$), OR 8.36 (1.457-47.93) y KIR 3DS4 ($p = 0.037$, $pc > .05$), OR 5.524 (1.169-26.098) se asociaron con una mayor tasa de uso de FAME. Por su parte, KIR 2DL3 fue positivo en los dos pacientes con

FAME en triple terapia, lo que resultó estadísticamente significativo ($p = 0.035$, $p < 0.05$).

TABLA 30. LIGANDOS KIR Y HAPLOTIPOS KIR. VARIABLES CUALITATIVAS DE TRATAMIENTO

KIR	Cortic		Metot		FAME		Biolog		Número FAME			Número de Biolog				
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	1	2	3	1	2	3	4	5
KIR 2DL1 (140)	79	61	83	57	109	31	124	16	102	5	2	93	17	8	4	2
KIR 2DL2 (93)	50	43	56	37	74	19	83	10	70	4	0	62	10	6	5	0
KIR 2DL3 (131)	74	57	78	53	102	29	116	15	98	2	2§	87	16	8	3	2
KIR 2DL5 (92)	48	44	52	40	69	23	81	11	66	3	0	60	12	6	3	0
KIR 3DL1 (145)	81	64	90	55	117§	28§	130	15	110	5	2	98	17	8	5	2
KIR 2DS1 (73)	42	31	40	33	54	19	63	10	52	2	0	51	5	5	2	0
KIR 2DS2 (94)	51	43	56	38	74	20	84	10	70	4	0	63	10	6	5	0
KIR 2DS3 (62)	33	29	33	29	47	15	54	8	44	3	0	41	8	4	1	0
KIR 2DS4 (144)	80	64	89	55	116§	28§	129	15	109	5	2	97	17	8	5	2
KIR 2DS5 (53)	28	25	33	20	41	12	47	6	40	1	0	35	7	3	2	0
KIR 3DS1 (81)	47	34	44	37	61	20	70	11	58	3	0	55	6	6	3	0
KIR 2DP1 (146)	79	67	88	58	115	31	129	17	108	5	2	98	17	8	4	2

§: p valor corregido ($p > 0,05$). Cortic: corticoesteroides; Metot: Metotrexato; FAME: Fármacos modificadores de la enfermedad; Biolog: fármacos biológicos; Número FAME: número de FAME en tratamiento combinado; Número Biolog: número de agentes biológicos en la historia del paciente.

OBJETIVO 9. Análisis de asociación entre variables cuantitativas seleccionadas y las frecuencias alélicas de los HLA clásicos, ligandos KIR, haplotipos KIR, genes KIR y otras asociaciones que hubieran resultado significativas en el estudio caso-control.

Para mayor simplicidad se realizó el estudio comparativo de los valores de las diferentes variables cuantitativas en aquellos resultados significativos en el estudio caso-control.

En el caso de HLA B*38, a pesar de ser positivo únicamente en dos pacientes, se obtuvo un valor medio significativamente menor de ACPA ($p = 0.005$) y mayor valor medio de C3 ($p = 0.004$).

En los pacientes portadores de KIR 2DS3 se obtuvo un resultado medio menor de FR en los pacientes que presentaban este alelo ($p = 0.032$).

Cabe destacar que el haplotipo B01 centromérico se asoció a un título significativamente menor de FR ($p = 0.02$), ACPA ($p = 0.048$), C3 ($p = 0.003$) y C4 ($p = 0.03$).

TABLA 31. VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ESTUDIO CASO-CONTROL. COMPARACIÓN DE MEDIAS RESPECTO A VARIABLES CUALITATIVAS

		FACTOR REUMATOIDE	ACPA	VSG	PCR	EDAD AL DEBUT	C3	C4	DAS28
HLA A*33	SI	230,00	116,67	15,67	,110	45,67	123,00	32,00	2,8200
	NO	101,35	139,17	24,53	1,098	42,45	123,20	24,81	3,9388
HLA B*38	SI	107,00	15,00	22,00	,535	39,50	186,00	56,00	2,5800
	NO	102,86	141,00	24,63	1,082	42,43	122,04	24,75	3,9113
HLA B*39	SI	117,59	214,00	23,55	,395	39,09	121,64	25,99	3,7945
	NO	101,70	133,06	24,68	1,132	42,66	123,04	25,12	3,9010
KIR 2DL5	SI	76,54	129,94	25,17	1,465	42,49	120,54	24,48	3,8114
	NO	149,42	155,78	22,77	,446	42,83	125,42	25,71	4,0895
KIR 2DS3	SI	63,16	121,55	23,15	,904	42,98	117,29	24,01	3,8024
	NO	134,18	152,92	24,99	1,187	42,37	126,04	25,63	4,0020
KIR 3DS1	SI	74,70	138,50	23,81	1,531	41,72	120,37	24,22	3,7510
	NO	140,10	141,82	24,74	,519	43,67	124,86	25,83	4,1157
HAPLOTIPO KIR	Bx	94,70	144,50	23,72	1,197	41,79	122,52	25,12	3,8596
	AA	159,61	116,43	26,88	,415	47,04	122,08	24,12	4,2400
HAPLOTIPO cB01	SI	57,97	108,63	21,88	,795	41,93	113,14	22,49	3,78
	NO	131,21	157,52	25,53	1,224	43,01	127,62	26,33	3,99

ACPA: Anticuerpo anti péptido citrulinado; VSG: Velocidad de sedimentación globular; PCR: Proteína C reactiva; DAS28: *disease activity score* 28.

DISCUSIÓN

Con respecto al primer objetivo del presente trabajo, destacar que se presenta un estudio genético de caso control en el que se incluyen 301 individuos, 151 pacientes con AR y 150 controles.

La población control no presenta diferencias significativas respecto a la población de pacientes en cuanto a sexo y edad en el momento del debut de la AR, por lo que se puede considerar adecuada para la comparación activa de las frecuencias alélicas estudiadas.

La representatividad de nuestra muestra de pacientes con AR viene determinada por el origen geográfico de la muestra y las características demográficas de la misma. En el Sureste de España la población es fundamentalmente caucásica, con algunos pacientes norte africanos que también pertenecen a ese mismo ancestro, aunque con algunas mínimas diferencias. En un metaanálisis holandés se profundiza en el hecho de que tanto la incidencia, prevalencia y características clínicas de los pacientes varía en función del área geográfica, siendo más severa y frecuente en población blanca respecto a africanos y asiáticos; la causa sería multifactorial atendiendo a factores genéticos y ambientales (184).

Nuestros pacientes con AR tuvieron una predominancia de sexo femenino (80%) y una edad media de debut de la enfermedad de 42 años. Como se ha mencionado en el apartado de epidemiología la incidencia en España de la AR es mayor en mujeres (0.6%) respecto a los hombres (0.2%) por lo que era esperable una mayor proporción de mujeres en la muestra. En el estudio EPISER 2000 la frecuencia de sexo femenino fue del 80%, igual que en el presente estudio. Los controles presentan una proporción similar con respecto al sexo y también con respecto a la edad de debut de la enfermedad. La edad media en el momento de la inclusión en el estudio fue de 56.3 años, mientras en el estudio EPISER 2000 fue de 59 años. En el estudio EPISER 2016, la media de edad en el momento de inclusión fue de 60,48 años y la proporción de sexo femenino fue del 61.5% (36). Otro aspecto destacable sería la mayor incidencia reportada en este último estudio al aplicar los criterios diagnósticos ACR de 2010 más modernos.

El tiempo de duración de la AR en nuestros pacientes fue de 162 meses de media que suponen más de 13 años de evolución, con una gran desviación estándar de más 10 años, abarcando desde un mes hasta 48 años de evolución de la enfermedad. La mediana fue 10 años de evolución de enfermedad, lo que indica que se trata de una población fundamentalmente de AR persistente de larga evolución; esto no es sorprendente ya que muchas de las muestras se obtuvieron en las instalaciones de Hospital de Día previo a la infusión de tratamiento biológico. Los niveles de actividad inflamatoria indican una alta tasa de enfermedad activa en el momento del análisis a pesar de las altas tasas de tratamiento con corticoide (56%), FAMEs (79%) y FAME biológico (89%). Por tanto, podemos afirmar que nuestra población con AR es predominantemente crónica y refractaria.

Respecto a las características clínicas de los pacientes con AR, como se ha mencionado la AR es una enfermedad heterogénea con variabilidad en cuanto a las manifestaciones clínicas entre las distintas series de pacientes.

Nuestros pacientes presentaron erosiones radiográficas en el 56.7% de las radiografías de manos y/o pies; la enfermedad erosiva se asoció a osteoporosis, mayor actividad de la enfermedad, positividad para ACPA y/o FR, una VSG media más elevada, mayor edad en el momento de inclusión en el estudio y más tiempo de evolución de la AR. Esta cifra de erosiones es relativamente baja en relación a lo esperable en una cohorte de AR de tan larga evolución. En una serie de pacientes chinos de reciente diagnóstico encontraron una prevalencia de enfermedad erosiva del 60% y en la mayoría de ellos las erosiones ocurrieron en los dos primeros años de enfermedad, sobre todo asociadas a la presencia de anemia, nódulos reumatoides y positividad para ACPA (185). Sin embargo, un estudio colombiano en 500 pacientes con AR de cinco años de evolución encuentra una prevalencia de enfermedad no erosiva del 2% en sus pacientes después de realizar TC y Ecografía y relaciona la ausencia de erosiones con una enfermedad más leve y negatividad para ACPA (186). Estas diferencias probablemente también estén determinadas por diferencias genéticas de ambas poblaciones, además del uso de técnicas más sensibles en la detección de erosiones.

Cuarenta y siete pacientes (31.1%) presentaron complicaciones oculares, lo que está en línea con lo observado por un estudio serbio realizado en 691 pacientes en el que encontraron afectación ocular en el 27.2% de los pacientes (187). No se encontraron asociaciones significativas en los pacientes con síntomas oculares respecto a la calidad de vida, actividad de la enfermedad, presencia de erosiones ni el resto de las manifestaciones extraarticulares. Treinta y seis pacientes (26.8%) presentaban una osteoporosis establecida, que se asoció significativamente con una mayor edad en el momento de la inclusión en el estudio, un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y una menor tasa de positividad y título medio de FR. No se encontró asociación de osteoporosis con otras complicaciones extraarticulares, calidad de vida, actividad de la enfermedad, uso de corticoides ni presencia de erosiones. Estos hallazgos son esperables en una población más envejecida y con mayor tiempo de evolución. En cuanto a la menor tasa de positividad de FR, un estudio chino relacionó la positividad de FR y ACPA con una mayor tasa de osteoporosis en cuello femoral y elevación del riesgo de fractura (188), algo que no observamos en nuestra cohorte.

Veinticinco pacientes (16.8%) presentaron nódulos reumatoides, una proporción que entra dentro de lo esperable ya que según observaciones previas hasta en el 7% de los pacientes al diagnóstico y hasta el 30% de ellos los pueden presentar durante la evolución de la enfermedad. Se ha asociado la presencia de nódulos a la positividad de factor reumatoide y a la presencia de otras manifestaciones extraarticulares de AR, particularmente severas en aquellos pacientes que presentan nódulos en los primeros dos años de enfermedad y también en aquellos con nódulos pulmonares y cardíacos. En nuestra cohorte observamos su asociación con positividad para FR, ACPA, carditis y neumopatía.

Quince pacientes (9.9%) presentaron una enfermedad intersticial pulmonar. La asociación pulmonar es relativamente frecuente en la AR y se ha asociado a sexo masculino, positividad para FR y ACPA, alta actividad inflamatoria e historia de tabaquismo (189). En nuestros pacientes, sin embargo, únicamente se encontró asociación con la presencia de nódulos reumatoides.

El riesgo cardiovascular en la AR está aumentado, en relación sobre todo con la actividad inflamatoria persistente y elevación persistente de reactantes de fase aguda. De hecho, en las últimas guías de la Sociedad Europea de Cardiología se recomienda utilizar un factor multiplicador x 1.5 en pacientes con AR (190). En nuestra cohorte, catorce pacientes (9.3%) tenían antecedente de evento cardiovascular y se relacionaron, como era de esperar, con una mayor media de edad en el momento de la inclusión, mayor actividad inflamatoria y menor tasa de remisión.

La vasculitis cutánea es relativamente infrecuente en la AR, ocurre entre el 2 y el 5% de los pacientes, generalmente en pacientes varones con alta actividad inflamatoria, erosiva, seropositiva y de larga duración (191). En nuestra serie 8 pacientes (5.3%) habían presentado vasculitis cutánea que se asoció significativamente la presencia de serositis, una peor calidad de vida y sorprendentemente a un menor título medio de ACPA.

La serositis en la AR es rara y sobre todo en el inicio de la enfermedad, debe hacer pensar en otros diagnósticos como la Enfermedad de Still o el Lupus Eritematoso sistémico. En nuestra serie de pacientes, únicamente seis (4%) presentaron serositis, lo que se asoció a vasculitis.

Por último, la carditis se presentó en cinco pacientes (3.3%), asociada con nódulos reumatoides, una peor calidad de vida y una mayor actividad de la enfermedad medida por DAS28, lo que está dentro de lo esperable en una cohorte de estas características.

En lo referente a los datos de calidad de vida y actividad de la enfermedad nuestros pacientes presentaron en su mayoría (67.7%) una actividad moderada o severa, y una calidad de vida relativamente bien conservada, con un 71% de pacientes con afectación nula o afectación leve. Como era de esperar aquellos con aumento de actividad inflamatoria presentaron peor calidad de vida. Una posible explicación sería el hecho de que los pacientes se encontraban en su mayoría en el momento previo a la infusión del tratamiento intravenoso, que es el momento en que menos cantidad de medicamento tienen en su organismo y por tanto pueden presentar mayor actividad o recuento articular sin que ello se refleje en su calidad de vida

global, que se pregunta respecto a la última semana y el último mes. La edad media de 56 años es relativamente baja y también ha podido influir en una calidad de vida relativamente conservada.

En cuanto a las pruebas de laboratorio, los valores medios de VSG y PCR reflejan una actividad inflamatoria por encima de lo normal, algo esperable en este contexto. Los niveles de complemento se encuentran en valores normales o por encima de lo normal en una amplia mayoría de pacientes, lo que indica que no hay consumo de complemento, algo, por otra parte, conocido en la AR. Las tasas de positividad de FR, resultaron algo bajas (54.3%) respecto a lo esperado, que se situaría en una horquilla del 50 al 70% de los pacientes, al igual que la positividad para ACPA, que en nuestra cohorte se sitúa en el extremo superior de esta horquilla (69.5%). La doble positividad es más rara y se sitúa cerca del 49% y la positividad de FR o ACPA llega al 73.5% de los pacientes, lo que sitúa nuestra tasa de seronegativos en el 26.5%, que sería del todo esperable en una cohorte de estas características. En cuanto a la positividad para anticuerpos antinucleares, en nuestra cohorte se sitúa en el 41.1%, una tasa esperable en la artritis reumatoide donde la positividad de estos autoanticuerpos se sitúa en torno al 50%. (192). En cuanto al resto de anticuerpos incluidos en el estudio no se han reportado beneficios en su determinación en la AR, pero se piden habitualmente en práctica clínica durante el proceso diagnóstico para excluir otros procesos autoinmunes concomitantes.

Por último, los tratamientos utilizados en nuestros pacientes reflejan una elevada tasa de tratamiento crónico con corticoides (56%) aunque a dosis bajas (en torno a 5 mg de prednisona o equivalente). Esto probablemente refleje el uso común de corticoesteroides a dosis bajas como FAME, una práctica de larga tradición que está ampliamente extendida (193). Respecto al uso de otros FAME, la tasa de tratamiento con FAMEs fue del 79% en nuestros pacientes, una alta proporción que refleja probablemente también la necesidad de su uso para evitar la aparición de anticuerpos antifármaco biológico, especialmente en el caso de infliximab. Metotrexato (72%) y leflunomida (24%) fueron los FAMEs más utilizados, una minoría de pacientes recibió otros FAMEs, casi siempre en combinación como marcan las recomendaciones de

las principales sociedades científicas (194). En cuanto a los FAMEb la tasa de tratamiento (89%) resultó aún mayor que para los FAMEs, con una clara dominación de tratamientos intravenosos (infiximab, tocilizumab y abatacept); la razón para esto es que los pacientes se reclutaron en el hospital de día de reumatología y la extracción de muestras se realizaba al mismo tiempo que se colocaba la vía para la administración del tratamiento. Destacar que el 75% de los pacientes conservaban el primer biológico pautado y que sólo el 24% tuvieron que progresar a otro tratamiento biológico. Todos estos datos son medidas indirectas de eficacia y tolerabilidad del tratamiento biológico (195). También hay que señalar que, dados los niveles de actividad de la enfermedad, posiblemente algunos pacientes se habrían beneficiado de un cambio de tratamiento biológico en el momento de la entrevista clínica.

En cuanto al segundo objetivo, el estudio comparativo de frecuencias alélicas de HLA de clase I entre pacientes y controles resultó en general poco fructífero, ya que únicamente un alelo del locus A y dos alelos del locus B resultaron significativamente asociados a la presencia de AR, y además al aplicar el factor de corrección de Bonferroni se perdía la significación en todos los casos. No es sorprendente ya que nuestro tamaño muestral no es comparable con otros estudios publicados. En una revisión reciente (6), se discute el papel del HLA-C en enfermedades reumáticas. Varios estudios basados en el análisis masivo de genes (genome wide sequencing analysis o GWAS) han encontrado asociación de la AR con otras regiones dentro y fuera del HLA, incluidos los locus HLA-A, B y C (196), también en términos de expresión génica e interacción proteica (197).

Un estudio similar al aquí expuesto se realizó en Noruega (4) pero incluyendo una muestra de casi mil pacientes y controles. En dicho estudio se realizó tipaje de HLA A, B, C y DR, y se observó una asociación significativa HLA-C, particularmente HLA-C*03, en AR seropositiva.

Un estudio sueco (112) comparando pacientes con AR positiva y negativa para ACPA, observó una asociación de HLA-C*03 con AR ACPA positiva y se asoció a vasculitis reumatoide mientras que HLA-C*06 y C*12 se asociaban negativamente a seropositividad y HLA-C*07 a pacientes

seronegativos. En el locus A este trabajo reporta una asociación negativa de A*29 y en el locus B con B*07 y B*35 mientras que B*15 se asocia a AR en seropositivos; los seronegativos se asociaron a B*08. En este estudio sueco no se comparan todos los pacientes con el grupo control por lo que no es del todo extrapolable a nuestro estudio. En nuestro caso hemos encontrado un efecto protector del alelo A*33 y B*38 mientras que B*39 se asoció a la presencia de AR de forma significativa. No hemos encontrado asociación significativa con enfermedad, vasculitis ni ninguna otra manifestación extraarticular ni para HLA-C*03 ni de ningún otro alelo HLA-C. Esto puede deberse al tamaño muestral, y al número de alelos posibles que se manejan en un estudio de los locus clásicos del HLA de clase I, o a características propias de nuestra población, como ocurrió en el estudio noruego en el que la de HLA-C, particularmente HLA-C*03, coincide con el estudio sueco pero los polimorfismos observados no tenían representación en los otros estudios realizados (191,196).

Con respecto al tercer objetivo, cuando estudiamos los ligandos KIR, no encontramos diferencias significativas al agrupar los distintos alelos por grupos C1/C2 ni Bw4/Bw6. Esto puede deberse una vez más al tamaño muestral, aunque no apreciamos una tendencia en ninguno de los grupos. La importancia de los ligandos KIR ha quedado patente en trasplante hematopoyético y de órgano sólido y se explica por el hecho de la incompatibilidad entre los ligandos que presenta el órgano sólido trasplantado respecto al repertorio KIR del huésped o al revés, del repertorio de ligandos del huésped frente al repertorio KIR de la célula NK derivada del injerto.

La importancia de este sistema KIR/HLA queda de manifiesto en las últimas recomendaciones de la Sociedad Europea para trasplante de médula ósea, donde se recomienda estudiar el repertorio KIR de donante y también el repertorio de ligandos HLA del receptor para mejorar la supervivencia del injerto (198).

Los modelos de incompatibilidad ligando-ligando utilizados para el trasplante medular se basan en la interacción de una célula del donante con las células somáticas del huésped, de forma que, si el huésped carece de ligandos para los KIR del donante, la célula NK (de estirpe hematopoyética) del donante

atacará al huésped. Esta incompatibilidad también parece importante en la inmunidad tumoral tras trasplante de médula ósea (199). En nuestro estudio sobre pacientes con AR al no haber incompatibilidad, la susceptibilidad también podría estar en KIR, en su ligando o a su interacción dependiente de su expresión en superficie.

Respecto al cuarto objetivo, al analizar el repertorio de genes KIR observamos que la AR en nuestra muestra se asocia a la presencia de KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR3DS1, aunque únicamente KIR2DS3 se mantuvo al aplicar la corrección de Bonferroni. La asociación con KIR2DL5 ha sido inesperada puesto que hasta ahora se había reportado un papel protector de este receptor. Los estudios sobre el papel de esta asociación hasta ahora han sido más escasos que aquellos realizados en HLA de clase I. En un metaanálisis (200) se agrupan todos los pacientes publicados en 11 estudios diferentes caso/control, englobando un total de 1847 pacientes y 2409 controles sanos, de varias poblaciones (cuatro europeos, cuatro asiáticos y tres americanos). Lo primero que llama la atención es la heterogeneidad entre estudios, de forma que los autores no llegan a conclusiones firmes, considerando un posible papel protector de KIR2DL3, KIR2DL5, KIR2DS5 y KIR3DL3 para el desarrollo de AR.

La interpretación de los resultados es muy compleja por lo que en este trabajo hemos tratado de hacer un abordaje funcional teniendo en cuenta la heredabilidad de los genes KIR, que presentan genes constantes que actúan como esqueleto o armazón sobre el que se van añadiendo el resto de genes para completar un haplotipo centromérico y otro telomérico que conforman el haplotipo definitivo. Dependiendo de la composición de estos haplotipos se pueden agrupar en A o B, aunque en un mismo sujeto puede haber combinaciones de haplotipos heredados de ambos gametos. La predominancia de haplotipos B en nuestra población de casos y controles es algo no esperado ya que en la mayoría de las poblaciones predomina el haplotipo A (95). El haplotipo A es más constante y se conserva bastante bien mientras que el B es mucho más variable y susceptible de recombinaciones (94). Quizás sea motivo de enfermedad autoinmune pero habría que confirmar en series más amplias.

Visto desde esta perspectiva, KIR2DL5 es un gen que se asocia únicamente a haplotipos B; de hecho, se asocia a haplotipos tB01, donde suele encontrarse junto a 3DS1 y 2DS3 o 2DS5, y a haplotipos cB01, donde se relaciona con 2DL2 y 2DS3. En los estudios de correlación efectivamente hay un ligamiento entre 3DS1, 2DL5 y 2DS3 por lo que presumiblemente se están heredando juntos, con una correlación menos potente entre KIR3DS1 y KIR2DS3 que se explicaría por el hecho de que van en haplotipos diferentes (KIR3DS1 es siempre telomérico mientras que KIR2DS3 puede estar en ambos). Este razonamiento concuerda totalmente con la fuerte asociación estadística observada en pacientes hacia el haplotipo B. No obstante, siguiendo este razonamiento no podríamos explicar la tendencia protectora observada en otros estudios para KIR2DL5.

Respecto al resto de asociaciones observadas en el metaanálisis de Aghaei et al. (200), KIR2DL3 sí es un gen exclusivo del haplotipo cA01 por lo que sería lógico pensar en un efecto protector, sobre todo en ausencia de cB01. KIR3DL3 es un gen que comparten los haplotipos cA01, cB01 y cB02, por lo que es más difícil establecer su relación causal. Por último, KIR2DS5 es un gen activador que sólo se encuentra en el haplotipo tB01 por lo que quizás sí se podría explicar una asociación de susceptibilidad autoinmune en nuestra población.

Nuestros hallazgos tienen sentido porque todos los genes KIR que hemos encontrado asociados a la AR en nuestra muestra se encuentran en el conocido como haplotipo B del locus KIR. El haplotipo B se ha relacionado con una mayor activación de la célula NK simplemente por disponer de un mayor repertorio de receptores con capacidad activadora y una mayor variabilidad de los mismos; además se desconocen buena parte de los ligandos que se unirán a ellos por lo que su función real continúa siendo misteriosa o no totalmente explicada.

Este abordaje ha sido utilizado con anterioridad y de hecho la presencia de haplotipo B en el donante se ha asociado con una mayor tasa de supervivencia de trasplante de médula ósea, asociando la presencia de haplotipo centromérico B a menor tasa de enfermedad injerto contra huésped;

el haplotipo telomérico B se asoció a una menor reactivación de citomegalovirus durante el acondicionamiento. La presencia de haplotipo centromérico A se asoció con una menor supervivencia (201).

Otro estudio estableció relación entre el haplotipo KIR A y la progresión de síndromes mielodisplásicos a leucemia mieloide aguda, que resultaba en una reducción de la supervivencia global y el tiempo de supervivencia hasta la progresión (202). También se ha estudiado un posible riesgo del haplotipo A telomérico en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 de debut tardío no portadores de mutaciones de alto riesgo en el HLA de clase II (DR3/DR4) (203). El haplotipo A también parece conferir un mayor riesgo de muerte en pacientes con sepsis (204).

Aunque los resultados no son completamente congruentes, podríamos postular que un haplotipo A sería menos reactivo y por tanto haría vulnerable al individuo a agresiones masivas como células cancerosas o infección, mientras que un haplotipo B más reactivo predispondría a una mayor autoinmunidad y supervivencia a situaciones donde la citólisis masiva puede ofrecer ventajas.

En el estudio de nuestra muestra hemos realizado un abordaje novedoso en el que no consideramos el haplotipo completo del paciente, tradicionalmente agrupado en haplotipos numéricos (1 al 9) sino que se han considerado los receptores específicos de cada haplotipo telomérico o centromérico para identificar los pacientes con carencia de haplotipo A y presencia de haplotipo B, tratando de distinguir, además, entre el haplotipo centromérico y telomérico.

Cuando se estudió la presencia de haplotipo A centromérico y telomérico se observó que la ausencia de ambos es muy rara en nuestra serie (sólo 2 pacientes y 1 control) por lo que, podríamos afirmar que la gran mayoría de nuestros sujetos disponían de al menos una copia de haplotipo A telomérico ó centromérico. KIR2DS4, exclusivo del haplotipo A telomérico, fue más frecuente en pacientes pero no presentó asociación estadística con ningún ligando ni haplotipo KIR. Esto contrasta de manera clara con un trabajo taiwanés (115) en el que se obtienen frecuencias para este KIR en pacientes y controles del 73 y 58 % respectivamente; En este mismo estudio KIR2DS3 resultó más frecuente en controles y KIR3DS1 mínimamente más frecuente en

pacientes sin alcanzar significación, lo que muestra de nuevo la gran variabilidad KIR entre poblaciones.

Sin embargo, KIR2DL3 (exclusivo del haplotipo A centromérico) estaba presente en más controles que pacientes y la diferencia resultaba significativa en aquellos individuos positivos para ligando C2-C2 y Bw6, tanto en homocigosis como en heterocigosis a pesar de no ser ligandos conocidos de KIR2DL3. Sorprendentemente, el haplotipo centromérico B01 y no el haplotipo BX presentó una asociación altamente significativa en el grupo de homocigotos para Bw6. Estos hallazgos indican que quizás los ligandos C2 y sobre todo Bw6, sean importantes en la activación de los receptores del haplotipo centromérico B01 y por tanto patogénicos en la AR.

Cuando estudiamos los haplotipos B, KIR2DL2 se encuentra fundamentalmente en el haplotipo B centromérico 01 (cB01) y también en el cB02 (que sería una versión truncada de cB01); para acotar más este haplotipo en cB01, se seleccionaron los pacientes con presencia simultánea de KIR2DL2, KIR2DL5 y KIR2DS3. Para identificar los pacientes con haplotipo telomérico B01 (tB01) se seleccionaron los pacientes con presencia simultánea de KIR3DS1, KIR2DL5 y KIR2DS3 o KIR2DS5.

Con este abordaje las diferencias observadas en los haplotipos agrupados (A o Bx) se mantenían cuando se seleccionaban pacientes con haplotipo cB01, lo que sugiere que probablemente este haplotipo tenga más relevancia en la patogenia de la AR, al menos en nuestra población.

Otro aspecto interesante para estudios futuros sería poder secuenciar completamente el locus KIR para conocer con exactitud no sólo el haplotipo centromérico y telomérico de los dos gametos, sino el número de copias de cada gen y su expresión en membrana.

Con respecto a los ligandos de KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR3DS1, la posibilidad de que su ligando no se encuentre dentro de los HLA de clase I expresados en la superficie celular es muy sugerente. De hecho, KIR2DL5 y KIR3DS1 contienen el dominio 0 en su estructura, que les confiere una carga positiva y por tanto tendencia unirse a heparán sulfato y activar su señalización

intracelular (100). Esta posibilidad es interesante para el reumatólogo, experto en enfermedades del tejido conectivo, por el enorme potencial de estas moléculas de glucosaminoglicanos para interactuar y regular multitud de procesos biológicos (98).

Con respecto a KIR2DS3, no existe ningún ligando conocido para él, aunque se ha asociado con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica o colitis ulcerosa, a variaciones en el curso clínico de infecciones virales y algunos tumores (205). Los estudios de expresión en superficie de KIR2DS3 indican que en raras ocasiones alcanza la superficie celular debido a residuos polimórficos en su estructura (206), por lo que es posible que se esté heredando junto con otros genes dentro de un haplotipo como el Bx o el B01 centromérico, o que su expresión sea transitoria.

Los estudios de polimorfismos de KIR2DS3 y KIR3DS1 muestran que la secuencia de interacción con el ligando está altamente conservada en población blanca, lo que indica que su unión con ligando (aunque no se conozca) debe ser relevante. En la sociedad del hombre blanco, protegida de estímulos inflamatorios e infecciosos, hay una selección positiva de haplotipos A carentes de estos genes activadores (207), que podrían proteger frente al desarrollo de enfermedades autoinmunes como la AR.

En cualquier caso, como ha quedado establecido, los tres KIR implicados se están heredando de forma simultánea por ligamiento y reflejan sobre todo la presencia de haplotipo B o cB01 en pacientes frente a controles.

Sería sumamente interesante en el futuro estudiar la expresión de los genes KIR en la célula NK en pacientes con AR, ya que es posible que diferentes grados de expresión de receptores puedan producir diferentes respuestas. Esto se puede realizar mediante PCR cuantitativa en tiempo real, midiendo el RNA mensajero específico, o también por citometría de flujo para observar con marcadores específicos la expresión en superficie de receptores KIR.

Con respecto al quinto objetivo, el estudio de ligandos KIR también resultó interesante cuando se realizó el estudio caso-control de asociación de

genes KIR con grupos de ligandos, ya que ninguno presentó diferencias en el estudio general.

Como se ha mencionado previamente, los pacientes homocigotos para el grupo de alelos C1 del HLA-C no presentaron ninguna asociación con el tipo de KIR. Esta observación resulta poco ilusionante porque esperábamos encontrar una relación en base a este dimorfismo en la posición 77 y 80 de la cadena $\alpha 1$. En el caso de los pacientes homocigotos para C2 de HLA-C se encontró asociación con una menor presencia de KIR2DL3 en pacientes y mayor presencia de KIR3DS1, aunque su significación no se mantuvo al corregir por Bonferroni. El ligando de KIR2DL3 descrito es HLA-C1 por lo que es lógico que presenten menor proporción de KIR2DL3. KIR3DS1 sin embargo no tiene ligando conocido dentro del HLA-C pero sí resultó más frecuente en pacientes respecto a controles aunque con una significación débil (anulada por el factor corrector de Bonferroni).

Los grupos más numerosos de pacientes (el grupo C1C2 con 52% y el C1X 87%) se asociaron positivamente con el haplotipo B y también con el haplotipo centromérico B01. KIR2DL2 resultó más frecuente en pacientes C1C2, reflejando la presencia de haplotipo cB01, ya que sus ligandos son HLA-A*03 y A*11 del grupo HLA-Bw6 y no tiene ligando conocido del grupo C. KIR2DS2 y 2DS3 resultaron más frecuentes en los pacientes con AR de estos grupos de ligandos aunque no resultaron significativas, probablemente en relación con la tendencia general de nuestra población.

Estos hallazgos sugieren que los ligandos determinados por el dimorfismo en las posiciones 77 y 80 de la cadena $\alpha 1$ de la molécula de HLA-C no tienen una influencia significativa en nuestra población de AR respecto a la población control.

En homocigotos y heterocigotos para Bw6 los pacientes asociaron a menor presencia de KIR2DL3, lo que era esperable ya que se asocia a haplotipo cA01, y una fuerte asociación para haplotipo B01 centromérico donde se encuentra KIR2DL2, cuyo ligando forma parte del grupo Bw6. El haplotipo Bx sólo fue significativo para Bw6 en heterocigosis. Sin embargo, los heterocigotos para Bw4, muy numerosos, presentaron las asociaciones

observadas en el análisis general y los homocigotos para Bw4 no presentaron ninguna asociación. En mi opinión, estos resultados indican que el papel de los ligandos Bw6 merecería ser explorado también en relación con los receptores KIR codificados en el haplotipo cB01, ya que podrían estar implicados en la patogenia de la AR; pero para poder hacerlo sería necesario aumentar el tamaño muestral considerablemente.

En el estudio de correlación dirigido a buscar asociaciones HLA/KIR, KIR2DS3 correlacionó levemente con presencia de HLA-C*06 en pacientes, pero no en controles, lo que es interesante ya que este alelo se asocia a enfermedad psoriásica. No se encontró sin embargo diferente proporción de sujetos con el binomio HLA-C*06/KIR2DS3 entre pacientes con AR y controles. El resto de las asociaciones no fueron relevantes por perder significación al aplicar el factor corrector de Bonferroni.

Por tanto, podemos concluir que el estudio de los ligandos específicos para KIR2DL5, KIR2DS3 y KIR2DS1 podría resultar relevante y muy interesante, aunque por su naturaleza sobrepasa las posibilidades del presente trabajo. En un estudio reciente ya comentado se demostró la unión de KIR3DS1 a heparan sulfato mediante resonancia de plasmones de superficie (100). También es posible observar uniones proteicas con detalle utilizando técnicas de análisis cristalográfico de complejos mediante rayos X, entre otras.

Con respecto al objetivo 6, en el estudio de los diferentes alelos HLA clásicos de clase I no se encontraron diferencias significativas respecto a las variables clínicas cualitativas una vez aplicado el factor corrector de Bonferroni. Por tanto, no hemos podido confirmar la asociación previamente descrita en población caucásica de HLA-C*03 con vasculitis reumatoide (111,112): tampoco con el HLA-C*08 como factor protector de vasculitis observado en población brasileña (113). En estos estudios se incluyeron muchos más pacientes con vasculitis que en el presente estudio, en el que únicamente había 8 pacientes con vasculitis.

Atendiendo a los genes KIR, en nuestros pacientes únicamente KIR2DL2 se asoció a una menor tasa de pacientes con alta actividad de la enfermedad y KIR3DS1 una menor proporción de pacientes con actividad

moderada. No se encontraron otras diferencias significativas para las variables clínicas, analíticas, de tratamiento ni cuantitativas una vez aplicado el factor corrector de Bonferroni. Por tanto, tampoco pudimos confirmar la asociación de vasculitis reumatoide con KIRD3 observada (191).

Al fijarnos en los ligandos KIR y haplotipos KIR, los pacientes homocigotos para Bw4 presentaron una mayor incidencia de serositis, los homocigotos para Bw6 mayor incidencia de eventos cardiovasculares y el haplotipo cB01 menor proporción de nódulos reumatoideos, lo que podría resultar de utilidad en clínica si se confirman estas observaciones con estudios más amplios en nuestra población u otras poblaciones.

Con respecto al objetivo 7, HLA-A*03 se asoció a seropositividad (ACPA o FR); este hallazgo no fue reportado por otros autores (4,112), lo que puede ser una observación casual o específica de nuestra población, por lo que sería interesante ampliar el estudio a un mayor número de pacientes. El haplotipo cB01 se asoció a menor tasa de positividad para FR, y doble positividad FR y ACPA.

En el objetivo 8, no se han encontrado diferencias respecto al perfil de tratamiento, necesidad de corticoide crónico, metotrexato o FAME, probablemente por el tamaño muestral y por no disponer de datos prospectivos o seriados de actividad que pudieran darnos una idea, aunque fuera aproximada, de su comportamiento clínico a lo largo de la evolución de la enfermedad.

En cuanto al objetivo 9, los individuos HLA B*38 presentaron valores medios de ACPA menores y mayor título de C3, pero este alelo sólo era portado por dos pacientes. El haplotipo cB01 se asoció a un menor título medio de FR, ACPA, C3 y C4.

Estos últimos resultados para el haplotipo cB01 son sumamente interesantes ya que abren una ventana de oportunidad para caracterizar al menos una parte de los pacientes denominados seronegativos, que son más difíciles de diagnosticar al carecer de marcadores específicos de laboratorio; además presentan menos nódulos, otro hallazgo bastante específico en el

marco de una poliartritis. Parece, además, que este subgrupo se podría caracterizar por una menor actividad inflamatoria ya que tanto KIR2DL2 como KIR3DS1 forman parte del haplotipo. Aun así, no se encontraron diferencias en cuanto a la presencia de erosiones, calidad de vida y resto de manifestaciones extraarticulares.

Las limitaciones del presente estudio, como ya se ha mencionado vienen inferidos por el tamaño muestral, que parece insuficiente para encontrar diferencias significativas en estudios de frecuencia alélica respecto a locus tan variables como los del HLA-A y -B. Con respecto al locus -C, con un número más limitado de alelos, se calculó consultando la página web www.allelefreqencies.net (208) para hacer una estimación del número de individuos portadores de cada alelo HLA-C, así como las frecuencias alélicas, esperadas en el grupo contro. Sus proporciones oscilan entre el 3 y el 45% para el caso de individuos y el 2 y el 26% para el de alelos, y empleando los valores habituales de nivel de significación ($\alpha = 95\%$) y de poder estadístico ($\beta = 80\%$) (209). Para un tamaño muestral de 150 individuos esperábamos ser capaces de detectar como significativas diferencias entre 10%-15%. A pesar de ello no se han detectado diferencias significativas en los alelos del locus HLA-C entre pacientes y controles.

Otra limitación clara del estudio estriba en la naturaleza retrospectiva en la caracterización de pacientes, junto con la entrevista clínica al paciente. Este abordaje no ha permitido caracterizar de forma precisa las manifestaciones clínicas, especialmente las extraarticulares, sin llegar a registrar por este motivo datos como por ejemplo el tipo de afectación pulmonar, oftálmica u otros. En cualquier caso, la diferenciación de estos subgrupos habría derivado en grupos menos numerosos con menos probabilidades de éxito estadístico en el análisis comparativo.

También debemos considerar un posible sesgo de selección ya que los pacientes en su mayoría se reclutaron en el Hospital de Día de Reumatología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. En un intento de reducir este sesgo se seleccionaron pacientes de una consulta de AR de reciente comienzo, pero no se puede asegurar tampoco en este caso que la muestra

represente fielmente a la población de AR de nuestro área geográfica ya que se aprovechó, por motivos éticos, una venopunción para analítica o acceso venoso con fines terapéuticos para la obtención de las muestras. Este hecho ha repercutido claramente en la proporción de tratamientos biológicos intravenosos de nuestra muestra, que resulta claramente desproporcionado con predominio de infliximab y tocilizumab frente a otros ampliamente utilizados como adalimumab o etanercept.

En definitiva y para concluir la discusión, en este estudio se ha detectado una asociación de la AR con la presencia de haplotipo KIR Bx y ausencia de haplotipo KIR A, demostrando la probable implicación de este sistema en la patogenia de la enfermedad. En particular se ha encontrado importancia predominante del extremo centromérico del haplotipo B, con asociación clara del haplotipo B01 centromérico (cB01). Hay que destacar que el receptor significativamente asociado a la enfermedad, KIR2DS3 no tiene un ligando conocido dentro del HLA de clase I clásico, ni tampoco los otros dos que hemos encontrado asociados (aunque no aguantaron la corrección de Bonferroni). Ambos (KIR3DS1 y KIR2DL5) tienen capacidad para unirse a otras moléculas no HLA como el heparán sulfato, presente en tejidos y superficies celulares. Además, estos tres genes correlacionan entre sí y con el haplotipo B y cB01 por lo que se estarían heredando juntos. Estos hallazgos podrían explicar la ausencia de ligando HLA de clase I asociado a la enfermedad reumatoide y centrarían la patogenia en la biología de las células NK y T citotóxicas con otras células y su entorno de tejido conectivo, sobre todo por su posible interacción con moléculas complejas como los glucosaminoglicanos. Como se ha comentado en la introducción, en la base de la patogenia encontramos alteraciones proteicas (citrulinización, carbamilación,...) derivadas de la citólisis recurrente por leucotoxinas, perforinas y otros agentes; las células NK y otras T citotóxicas portadoras KIR del haplotipo B podrían estar activándose por glucosaminoglicanos con alteración biopatológica derivada de la enfermedad periodontal o en estroma sinovial, por ejemplo. En contra de esta hipótesis está el hecho de que el FR resulta menos frecuente en este grupo de pacientes y el título de autoanticuerpos citrulinados es más bajo, aunque también es posible que presenten otro perfil de autoanticuerpos menos

usados en práctica clínica. Sería interesante detectar, *in situ*, la interacción biológica entre KIR y glucosaminoglicanos a nivel periodontal o sinovial, aunque a día de hoy estos estudios son altamente complejos.

Para finalizar, aunque no se ha encontrado un perfil de paciente que responda a la genética de esta interacción HLA-KIR, la exploración ha sido concienzuda; en el futuro se podría aumentar la muestra de pacientes o integrar nuestras muestras en repertorios nacionales o internacionales de ADN de pacientes con AR.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio no se ha encontrado asociación significativa de la AR con alelos de HLA de clase I, aunque puede ser debido a la limitación impuesta por el tamaño muestral.
2. No se ha encontrado asociación significativa de la AR con ligandos KIR tanto de HLA-C como de HLA Bw4 o Bw6.
3. Si se ha encontrado asociación significativa de la AR con el gen KIR2DS3 , el haplotipo KIR Bx y el haplotipo centromérico B01.
4. La asociación del haplotipo B con la AR se mantuvo en los sujetos portadores de ligando C1X y C1C2, así como Bw6 y Bw4 en heterocigosis, probablemente por ser los grupos más numerosos.
5. El haplotipo centromérico B01 se asoció a sujetos con ligando Bw6 en homocigosis y los pacientes con AR y este haplotipo presentaron menor tasa de nódulos reumatoides, los homocigotos para Bw4 una mayor incidencia de serositis y los homocigotos para Bw6 mayor incidencia de eventos cardiovasculares en el estudio de variables cualitativas clínicas.
6. En el estudio de variables cualitativas de laboratorio, HLA-A*03 se asoció a seropositividad para FR o ACPA. Los pacientes con haplotipo cB01 mostraron una menor positividad de FR y menor proporción de doble positividad (FR más ACPA).
7. En el estudio de variables cualitativas de tratamiento no se encontraron asociaciones significativas.
8. En el análisis de variables cuantitativas El haplotipo cB01 sí se pudo asociar a menores valores medios de FR, ACPA, C3 y C4. También los pacientes KIR 2DS3 presentaban un valor medio menor de FR.
9. Los resultados en general apuntan a una influencia de los genes KIR y haplotipo KIR en nuestra población, aunque sería interesante explorar más exhaustivamente la influencia de los ligandos del grupo Bw6.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 Jul [cited 2018 Jun 11];73(7):1316–22. Available from: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2013-204627>
2. Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MÁ, Carmona L. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2008 [cited 2022 Jul 25];47(7):1088–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18511475/>
3. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* [Internet]. 2016 Oct 22 [cited 2018 May 7];388(10055):2023–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156434>
4. Nordang GBN, Flåm ST, Maehlen MT, Kvien TK, Viken MK, Lie BA. HLA-C alleles confer risk for anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis independent of HLA-DRB1 alleles. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2013;52(11):1973–82.
5. Nazari M, Mahmoudi M, Rahmani F, Akhlaghi M, Beigy M, Azarian M, et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes in Iranian Patients with Rheumatoid Arthritis. Allen RL, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 11 [cited 2018 Oct 4];10(12):e0143757. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658904>
6. Siegel RJ, Bridges SL, Ahmed S. HLA-C: An Accomplice in Rheumatic Diseases. *ACR open Rheumatol* [Internet]. 2019 Nov [cited 2022 May 23];1(9):571–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31777841/>
7. AJ LB. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2018 Jun 14];68(2):130–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X00002475?via%3Dihub>
8. Charcot JM. *Etudes pour servir a l'histoire de l'affection decrite sous les noms de goutte asthenique primitive, nodosités des jointures, rhumatisme articulaire chronique (forme primitive), etc.* Paris; 1953.
9. Garrod AB. *The nature and treatment of gout and rheumatic gout.* [Internet]. London: Walton and Maberly; 1859. p. xvi, 601 p. Available from: <file://catalog.hathitrust.org/Record/006664329>
10. Kwiecinski J, Rothschild BM. No rheumatoid arthritis in ancient Egypt: a reappraisal. *Rheumatol Int* [Internet]. 2016 Jun 9 [cited 2018 Jun 14];36(6):891–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26650735>
11. Aceves-Avila FJ, Medina F, Fraga A. The antiquity of rheumatoid arthritis: a reappraisal. *J Rheumatol* [Internet]. 2001 Apr [cited 2018 Jun 14];28(4):751–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327245>
12. Bywaters EG. Historical aspects of the aetiology of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* [Internet]. 1988 [cited 2018 Jun 15];27 Suppl 2:110–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042069>
13. Mackay IR, Burnet FM. *Autoimmune diseases : pathogenesis, chemistry, and therapy* [Internet]. Springfield, Ill.: Charles C Thomas; 1963. Available from: <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/2229721.html>
14. HENCH PS, KENDALL EC. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* [Internet]. 1949 Apr 13 [cited 2018 Jun

- 15];24(8):181–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18118071>
15. GOLD therapy in rheumatoid arthritis. Report of a multicentre control trial. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1960 Jun [cited 2018 Jun 15];19:95–119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13856636>
 16. SVARTZ N. Treatment of rheumatoid arthritis with salicylazosulfapyridine. *Acta Med Scand Suppl* [Internet]. 1958 [cited 2018 Jun 15];341:247–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13605652>
 17. BAGNALL AW. The value of chloroquine in rheumatoid disease: a four-year study of continuous therapy. *Can Med Assoc J* [Internet]. 1957 Aug 1 [cited 2018 Jun 15];77(3):182–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13446795>
 18. KERSLEY GD, PALIN AG. Amodiaquine and hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1959 Nov 21 [cited 2018 Jun 15];2(7108):886–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14408648>
 19. Controlled trial of D(-)penicillamine in severe rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1973 Feb 10 [cited 2018 Jun 15];1(7798):275–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4119168>
 20. JIMENEZ DIAZ C, LOPEZ GARCIA E, MERCHANTE A, PERIANES J. Treatment of rheumatoid arthritis with nitrogen mustard; preliminary report. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1951 Dec 8 [cited 2018 Jun 15];147(15):1418–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14873702>
 21. Ward JR. Historical perspective on the use of methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* [Internet]. 1985 Dec [cited 2018 Jun 15];12 Suppl 1:3–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3913774>
 22. O'Dell JR, Haire CE, Erikson N, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ, et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis with Methotrexate Alone, Sulfasalazine and Hydroxychloroquine, or a Combination of All Three Medications. *N Engl J Med* [Internet]. 1996 May 16 [cited 2018 Jun 16];334(20):1287–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609945>
 23. Smolen JS, Kalden JR, Scott DL, Rozman B, Kvien TK, Larsen A, et al. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial. *European Leflunomide Study Group. Lancet (London, England)* [Internet]. 1999 Jan 23 [cited 2018 Jun 16];353(9149):259–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9929017>
 24. Fries JF, Williams CA, Morfeld D, Singh G, Sibley J. Reduction in long-term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1996 Apr [cited 2018 Jun 16];39(4):616–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630111>
 25. Jorgensen C, Apparailly F, Sany J. Immunological evaluation of cytokine and anticytokine immunotherapy in vivo: what have we learnt? *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1999 Mar [cited 2018 Jun 16];58(3):136–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364909>
 26. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1994 Oct 22 [cited 2022 Jul 26];344(8930):1105–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7934491/>
 27. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 25];69(4):631–7. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20215140/>
28. MacGregor AJ. Classification criteria for rheumatoid arthritis. *Baillière's Clin Rheumatol* [Internet]. 1995 May [cited 2018 Jun 18];9(2):287–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656341>
 29. Bennett PH, Burch T. New York Symposium on population studies in the rheumatic diseases: new diagnostic criteria. *Bull Rheum Dis*. 1967;17:453–8.
 30. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1988 Mar [cited 2018 Jun 11];31(3):315–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>
 31. Sokolove J, Strand V. Rheumatoid arthritis classification criteria - It's finally time to move on! *Bull NYU Hosp Jt Dis* [Internet]. 2010 [cited 2018 Jun 23];68(3):232–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969557>
 32. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Iii COB, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria : an American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2018 Jun 11];69(9):1580–8. Available from: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2010.138461>
 33. Del Puente A, Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH. High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1989 Jun [cited 2018 Jun 18];129(6):1170–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2786329>
 34. Harvey J, Lotze M, Stevens MB, Lambert G, Jacobson D. Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1981 May [cited 2018 Jun 18];24(5):717–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7236326>
 35. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2002 Jan [cited 2018 Jun 23];41(1):88–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792885>
 36. Silva-Fernández L, Macía-Villa C, Seoane-Mato D, Cortés-Verdú R, Romero-Pérez A, Quevedo-Vila V, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 1];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33299019/>
 37. Cohen MG, Li EK, Ng PY, Chan KL. Extra-articular manifestations are uncommon in southern Chinese with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* [Internet]. 1993 Mar [cited 2018 Jun 23];32(3):209–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448610>
 38. Drosos AA, Lanchbury JS, Panayi GS, Moutsopoulos HM. Rheumatoid arthritis in Greek and British patients. A comparative clinical, radiologic, and serologic study. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1992 Jul [cited 2018 Jun 23];35(7):745–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1622412>
 39. Jacobsson LT, Hanson RL, Knowler WC, Pillemer S, Pettitt DJ, McCance DR, et al. Decreasing incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians over a twenty-five-year period. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1994 Aug [cited 2018 Jun 23];37(8):1158–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8053953>
 40. Ali-Gombe A, Adebajo A, Silman A. Methodological problems in comparing the severity of rheumatoid arthritis between populations. *Rheumatology* [Internet]. 1995 Aug [cited 2018 Jun 23];34(8):781–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7551666>

41. Mikuls TR, Kazi S, CIPHER D, Hooker R, Kerr GS, Richards JS, et al. The association of race and ethnicity with disease expression in male US veterans with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2018 Jun 23];34(7):1480–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552044>
42. López-Méndez A, Paul WA, Alarcón GS. Rheumatoid arthritis in American blacks: a clinical and radiological study. *J Rheumatol* [Internet]. 1989 Sep [cited 2018 Jun 23];16(9):1197–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2810275>
43. Gritz DC, Wong IG. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology* [Internet]. 2004 Mar [cited 2017 Nov 8];111(3):491–500; discussion 500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642003014891>
44. Iren UT, Walker MS, Hochman E, Brasington R. A pilot study to determine whether disability and disease activity are different in African-American and Caucasian patients with rheumatoid arthritis in St. Louis, Missouri, USA. *J Rheumatol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2018 Jun 23];32(4):602–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15801013>
45. Sokka T, Abelson B, Pincus T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. [cited 2018 Jun 25];26(5 Suppl 51):S35-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026144>
46. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Jt Bone Spine* [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 Jun 25];80(1):29–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459416>
47. Humphreys JH, Warner A, Chipping J, Marshall T, Lunt M, Symmons DPM, et al. Mortality Trends in Patients With Early Rheumatoid Arthritis Over 20 Years: Results From the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2014 Sep [cited 2018 Jun 25];66(9):1296–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497371>
48. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2018 Sep 18];4:18001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29417936>
49. Frisell T, Hellgren K, Alfredsson L, Raychaudhuri S, Klareskog L, Askling J. Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2016 Jan [cited 2018 Sep 21];75(1):183–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498119>
50. Klein K, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Sep 21];27(1):76–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415526>
51. Scher JU, Bretz WA, Abramson SB. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2018 Sep 21];26(4):424–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807405>
52. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2018 Sep 21];535(7610):75–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27383982>
53. Humby F, Kelly S, Hands R, Rocher V, DiCicco M, Ng N, et al. Use of Ultrasound-Guided Small Joint Biopsy to Evaluate the Histopathologic Response to Rheumatoid Arthritis Therapy: Recommendations for Application to Clinical Trials. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Sep 22];67(10):2601–10. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097225>
54. Dolhain RJ, Ter Haar NT, De Kuiper R, Nieuwenhuis IG, Zwinderman AH, Breedveld FC, et al. Distribution of T cells and signs of T-cell activation in the rheumatoid joint: implications for semiquantitative comparative histology. *Br J Rheumatol* [Internet]. 1998 Mar [cited 2018 Sep 22];37(3):324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566675>
 55. Feldmann M, Maini SRN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* [Internet]. 2008 Jun [cited 2018 Sep 22];223(1):7–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613827>
 56. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL–RANK–OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Oct 20 [cited 2018 Sep 22];5:511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368616>
 57. Jiang X, Trouw LA, Van Wesemael TJ, Shi J, Bengtsson C, Källberg H, et al. Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 Oct [cited 2020 Mar 9];73(10):1761–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812286>
 58. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Vol. 146, *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians; 2007. p. 797–808.
 59. Hogben DN, Devey ME. Studies on rheumatoid factor: I. The effect of rheumatoid factor on the clearance of preformed immune complexes in mice. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1986 Dec [cited 2020 Mar 9];66(3):648–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3568452>
 60. Maibom-Thomsen SL, Trier NH, Holm BE, Hansen KB, Rasmussen MI, Chailyan A, et al. Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Mar 9];14(6):e0217624. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31199818>
 61. Jónsson T, Steinsson K, Jónsson H, Geirsson ÁJ, Thorsteinsson J, Valdimarsson H. Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* [Internet]. 1998 [cited 2020 Mar 9];18(3):119–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9833253>
 62. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor– and Complement-Dependent Effector Functions of the Disease-Specific Anti–Citrullinated Protein Autoantibodies. *J Immunol* [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2018 Sep 21];194(8):3664–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769920>
 63. Proost P, Loos T, Mortier A, Schutyser E, Gouwy M, Noppen S, et al. Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2020 Mar 9];205(9):2085–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710930>
 64. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Nov 29 [cited 2020 Mar 9];271(48):30709–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940048>
 65. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016 Dec 14

- [cited 2020 Mar 9];8(369):369ra176. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27974664>
66. König MF, Andrade F. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Nov 4 [cited 2020 Mar 9];7(NOV):461. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27867381>
 67. Blachère NE, Parveen S, Frank MO, Dill BD, Molina H, Orange DE. High-Titer Rheumatoid Arthritis Antibodies Preferentially Bind Fibrinogen Citrullinated by Peptidylarginine Deiminase 4. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2020 Mar 9];69(5):986–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28029744>
 68. Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination [Internet]. Vol. 30, *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2020 Mar 9]. p. 72–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28937414>
 69. Wang F, Chen F-F, Gao W-B, Wang H-Y, Zhao N-W, Xu M, et al. Identification of citrullinated peptides in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using LC-MALDI-TOF/TOF. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Mar 9];35(9):2185–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060082>
 70. Klarenbeek PL, de Hair MJH, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveldt REE, van de Sande MGH, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2012 Jun [cited 2018 Sep 21];71(6):1088–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294635>
 71. de Hair MJH, Zijlstra IJAJ, Boumans MJH, van de Sande MGH, Maas M, Gerlag DM, et al. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Sep 21];71(11):1911–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689316>
 72. Kerkman PF, Fabre E, van der Voort EIH, Zaldumbide A, Rombouts Y, Rispens T, et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 Sep 21];75(6):1170–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26034045>
 73. Rombouts Y, Willemze A, Van Beers JJBC, Shi J, Kerkman PF, Van Toorn L, et al. Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2020 Mar 9];75(3):578–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25587188>
 74. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis [Internet]. *Journal of Autoimmunity*. Academic Press; 2020 [cited 2020 Mar 9]. p. 102392. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31911013>
 75. Boer AC, Boonen A, van der Helm van Mil AHM. Is Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis Still a More Severe Disease Than Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis? A Longitudinal Cohort Study in Rheumatoid Arthritis Patients Diagnosed From 2000 Onward. *Arthritis Care Res* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2020 Mar 10];70(7):987–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29266813>
 76. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, Esen F, Tahralli I, Akdeniz N, Gelmez MY, et al. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Feb 25 [cited 2022 May 12];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33717125/>
 77. Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited

- 2022 May 12];17(2):142–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29180124/>
78. Söderströma K, Stein E, Colmenero P, Purath U, Müller-Ladner U, De Matos CT, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Jul 20 [cited 2022 May 16];107(29):13028–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20615964/>
 79. Lin SJ, Hsu CY, Kuo ML, Lee PT, Hsiao HS, Chen JY. Phenotypic and functional characterization of natural killer cells in rheumatoid arthritis-regulation with interleukin-15. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 May 16];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32246007/>
 80. Kelly A, Trowsdale J. Introduction: MHC/KIR and governance of specificity. *Immunogenetics* [Internet]. 2017 Aug 10 [cited 2018 Sep 25];69(8–9):481–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28695288>
 81. Fisette O, Wingbermühle S, Tampé R, Schäfer L V. Molecular mechanism of peptide editing in the tapasin-MHC I complex. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jan 12 [cited 2018 Sep 25];6(1):19085. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep19085>
 82. Busch R, Kollnberger S, Mellins ED. HLA associations in inflammatory arthritis: emerging mechanisms and clinical implications. Vol. 15, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 364–81.
 83. Parham P, Abi-Rached L, Matevosyan L, Moesta AK, Norman PJ, Older Aguilar AM, et al. Primate-specific regulation of natural killer cells. *J Med Primatol* [Internet]. 2010 Aug 2 [cited 2018 Oct 3];39(4):194–212. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0684.2010.00432.x>
 84. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* [Internet]. 1998 Feb 19 [cited 2018 Sep 25];391(6669):795–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/35869>
 85. van Meijgaarden KE, Haks MC, Caccamo N, Dieli F, Ottenhoff THM, Joosten SA. Human CD8+ T-cells Recognizing Peptides from Mycobacterium tuberculosis (Mtb) Presented by HLA-E Have an Unorthodox Th2-like, Multifunctional, Mtb Inhibitory Phenotype and Represent a Novel Human T-cell Subset. Ehrh S, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2015 Mar 24 [cited 2018 Sep 25];11(3):e1004671. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004671>
 86. Parham P. MHC class I molecules and KIRS in human history, health and survival. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2005. p. 201–14.
 87. Boyington JC, Brooks AG, Sun PD. Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol Rev* [Internet]. 2001 Jun [cited 2018 Sep 25];181:66–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513153>
 88. Apps R, Qi Y, Carlson JM, Chen H, Gao X, Thomas R, et al. Influence of HLA-C Expression Level on HIV Control. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Apr 5 [cited 2018 Sep 25];340(6128):87–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559252>
 89. Chappell P, Meziane EK, Harrison M, Magiera Ł, Hermann C, Mears L, et al. Expression levels of MHC class I molecules are inversely correlated with promiscuity of peptide binding. *Elife* [Internet]. 2015 Apr 10 [cited 2018 Sep 25];4:e05345. Available from: <https://elifesciences.org/articles/05345>
 90. Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* [Internet]. 2006 Sep [cited 2018 Oct 3];7(1):277–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824023>

91. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* [Internet]. 1997 Dec [cited 2018 Sep 25];7(6):753–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430221>
92. Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2018 Oct 3];46(4):216. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22259627>
93. Maniangu B, Legrand N, Alizadeh M, Guyet U, Willem C, David G, et al. Killer immunoglobulin-like receptor allele determination using next-generation sequencing technology. *Front Immunol*. 2017 May 19;8(MAY):547.
94. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, et al. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 May 23];22(10):1845–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22948769/>
95. Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Jul 27];267(1):178–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26284478/>
96. Müller CA, Engler-Blum G, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, Schmidt H. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics*. 1989 Sep;30(3):200–7.
97. Rajalingam R. The impact of HLA class I-specific killer cell immunoglobulin-like receptors on antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity and organ allograft rejection. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
98. Sasisekharan R, Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2000 [cited 2022 Jul 26];4(6):626–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11102866/>
99. Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, Hershkovitz O, Andrade MD, Pecherskaya A, et al. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J Immunol* [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2022 Jul 22];191(10):5256–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24127555/>
100. Klein K, Hölzemer A, Wang T, Kim TE, Dugan HL, Jost S, et al. A Genome-Wide CRISPR/Cas9-Based Screen Identifies Heparan Sulfate Proteoglycans as Ligands of Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Nov 30 [cited 2022 Jul 20];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34917099/>
101. Sips M, Liu Q, Draghi M, Ghebremichael M, Berger CT, Suscovich TJ, et al. HLA-C levels impact natural killer cell subset distribution and function. *Hum Immunol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Sep 25];77(12):1147–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521484>
102. Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V. Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics* [Internet]. 2010 Dec 29 [cited 2018 Oct 3];62(11–12):767–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-010-0480-x>
103. Alter G, Heckerman D, Schneidewind A, Fadda L, Kadie CM, Carlson JM, et al. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 3 [cited 2018 Oct 3];476(7358):96–100. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10237>
104. Płoski R, Łuszczek W, Kuśnierczyk P, Nockowski P, Cisko M, Krajewski P, et al. A Role for KIR Gene Variants Other Than KIR2DS1 in Conferring Susceptibility to Psoriasis.

- Hum Immunol [Internet]. 2006 Jul [cited 2018 Oct 3];67(7):521–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829306>
105. Mehers KL, Long AE, van der Slik AR, Aitken RJ, Nathwani V, Wong FS, et al. An increased frequency of NK cell receptor and HLA-C group 1 combinations in early-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2011 Dec 10 [cited 2018 Oct 3];54(12):3062–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909837>
 106. López-Álvarez MR, Campillo JA, Legaz I, Blanco-García RM, Salgado-Cecilia G, Bolarín JM, et al. Divergences in KIR2D+ natural killer and KIR2D+CD8+ T-cell reconstitution following liver transplantation. *Hum Immunol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Oct 3];72(3):229–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215286>
 107. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SGE, et al. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol* [Internet]. 2014 May 15 [cited 2018 Oct 3];192(10):4592–600. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302517>
 108. Moffett A, Colucci F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 Sep [cited 2018 Oct 3];267(1):283–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284484>
 109. Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, et al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2018 Oct 8];165(2):1138–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878393>
 110. Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, Weyand CM. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1997 Jun [cited 2018 Oct 8];40(6):1106–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182921>
 111. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* [Internet]. 2001 May 21 [cited 2018 Sep 27];193(10):1159–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369787>
 112. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. Association of HLA-C3 and smoking with vasculitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006 Sep [cited 2018 Oct 4];54(9):2776–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16947780>
 113. Nishimura WE, Sachetto Z, Costallat LTL, Yazbek MA, Londe ACS, Guariento EG, et al. The role of KIR2DL3/HLA-C*0802 in Brazilian patients with rheumatoid vasculitis. *Clinics (Sao Paulo)* [Internet]. 2015;70(6):408–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4462576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 114. Zhang Y, Zhang H, Huang Y, Sun R, Liu R, Wei J. Human leukocyte antigen (HLA)-C polymorphisms are associated with a decreased risk of rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2014 Jun 25 [cited 2018 Oct 4];41(6):4103–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566686>
 115. Yen J -H., Lin C -H., Tsai W -C., Wu C -C., Ou T -T., Hu C -J., et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* [Internet]. 2006 Jan 25 [cited 2018 Oct 4];35(2):124–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641046>
 116. Middleton D, Meenagh A, Wright GD. No association in frequency of KIR receptors in patients with rheumatoid arthritis from Northern Ireland. *Tissue Antigens* [Internet]. 2007 Jun [cited 2018 Oct 8];69(6):577–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2007.00828.x>

117. Majorczyk E, Pawlik A, Gendosz D, Kuśnierczyk P. Presence of the full-length KIR2DS4 gene reduces the chance of rheumatoid arthritis patients to respond to methotrexate treatment. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2014 Dec 28 [cited 2018 Oct 4];15(1):256. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069714>
118. McGeough CM, Berrar D, Wright G, Mathews C, Gilmore P, Cunningham RT, et al. Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen-C genotypes in rheumatoid arthritis primary responders and non-responders to anti-TNF- α therapy. *Rheumatol Int* [Internet]. 2012 Jun 4 [cited 2018 Oct 4];32(6):1647–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373785>
119. Fleming A, Crown JM, Corbett M. Early rheumatoid disease. I. Onset. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1976 Aug [cited 2018 Sep 16];35(4):357–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/970994>
120. Pinals RS. Polyarthrititis and Fever. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Mar 17 [cited 2018 Sep 20];330(11):769–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8107744>
121. Fleming A, Benn RT, Corbett M, Wood PH. Early rheumatoid disease. II. Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1976 Aug [cited 2018 Sep 18];35(4):361–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/970995>
122. Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Jhangri GS, Ramos-Remus C, Russell AS, Suarez-Almazor ME. Prognostic factors for the development of rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases in patients with palindromic rheumatism. *J Rheumatol* [Internet]. 1999 Mar [cited 2018 Sep 18];26(3):540–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090159>
123. Prasad K, Rath D, Kundu B. Arthritis Robustus: review of a case of an “abnormal” rheumatoid. *Springerplus* [Internet]. 2014 [cited 2018 Sep 24];3(1):606. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392778>
124. Fleming A, Dodman S, Crown JM, Corbett M. Extra-articular features in early rheumatoid disease. *Br Med J* [Internet]. 1976 May 22 [cited 2018 Sep 18];1(6020):1241–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1083759>
125. Healey LA. Polymyalgia rheumatica and seronegative rheumatoid arthritis may be the same entity. *J Rheumatol* [Internet]. 1992 Feb [cited 2018 Sep 24];19(2):270–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629826>
126. Li H, Altman RD, Yao Q. RS3PE: Clinical and Research Development. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2015 Aug 26 [cited 2018 Sep 24];17(8):49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113011>
127. Yaghami I, Rooholamini SM, Faunce HF. Unilateral rheumatoid arthritis: protective effect of neurologic deficits. *AJR Am J Roentgenol* [Internet]. 1977 Feb [cited 2018 Sep 18];128(2):299–301. Available from: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/ajr.128.2.299>
128. Harris ED, Ruddy S, Kelley WN. *Kelley’s textbook of rheumatology* [Internet]. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Saunders : Elsevier; 2005. Available from: <http://books.google.com/books?id=KmVqAAAAMAAJ>
129. Smith PH, Benn RT, Sharp J. Natural history of rheumatoid cervical luxations. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1972 Nov [cited 2018 Sep 18];31(6):431–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4634761>
130. Collins DN, Barnes CL, FitzRandolph RL. Cervical spine instability in rheumatoid patients having total hip or knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1991 Nov [cited 2018 Sep 18];(272):127–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1934722>
131. Mesa-del-Castillo P, Castellón M, Martínez-Angosto FA, Gálvez P. Enfermedad

- Reumatoide Vertebral Subcervical [Internet]. Vol. 30, Rev. chil. reumatol. 2014 [cited 2018 Sep 18]. Available from: <http://www.sochire.cl/bases/r-659-1-1395756480.pdf>
132. Goupille P, Fouquet B, Cotty P, Goga D, Mateu J, Valat JP. The temporomandibular joint in rheumatoid arthritis. Correlations between clinical and computed tomography features. *J Rheumatol* [Internet]. 1990 Oct [cited 2018 Sep 18];17(10):1285–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2254886>
 133. Cordeiro PC, Guimaraes JP, de Souza VA, Dias IM, Silva JN, Devito KL, et al. Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis patients: association between clinical and tomographic data. *Acta Odontol Latinoam* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Sep 18];29(3):123–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28383601>
 134. Lawry G V, Finerman ML, Hanafee WN, Mancuso AA, Fan PT, Bluestone R. Laryngeal involvement in rheumatoid arthritis. A clinical, laryngoscopic, and computerized tomographic study. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1984 Aug [cited 2018 Sep 18];27(8):873–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6466395>
 135. Chung KC, Pushman AG. Current Concepts in the Management of the Rheumatoid Hand. *J Hand Surg Am* [Internet]. 2011 Apr [cited 2018 Sep 18];36(4):736–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463736>
 136. Jaakkola JI, Mann RA. A Review of Rheumatoid Arthritis Affecting the Foot and Ankle. *Foot Ankle Int* [Internet]. 2004 Dec 28 [cited 2018 Sep 18];25(12):866–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680099>
 137. GÖKSEL KARATEPE A, GÜNAYDIN R, ADIBELLI ZH, KAYA T, DURUÖZ E. Foot deformities in patients with rheumatoid arthritis: the relationship with foot functions. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2018 Sep 18];13(2):158–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536601>
 138. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* [Internet]. 2002 Jan [cited 2018 Sep 18];29(1):62–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11824973>
 139. Das S, Padhan P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *J Pharmacol Pharmacother* [Internet]. [cited 2018 Sep 18];8(3):81–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29081614>
 140. Ziff M. The rheumatoid nodule. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1990 Jun [cited 2018 Sep 18];33(6):761–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2194460>
 141. Hartmann P, Mohokum M, Schlattmann P. The association of Raynaud's syndrome with rheumatoid arthritis—a meta-analysis. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2011 Aug 2 [cited 2018 Sep 19];30(8):1013–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461651>
 142. Voskuyl AE, Zwinderman AH, Westedt ML, Vandenbroucke JP, Breedveld FC, Hazes JM. The mortality of rheumatoid vasculitis compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1996 Feb [cited 2018 Sep 18];39(2):266–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849377>
 143. Ntatsaki E, Mooney J, Scott DGI, Watts RA. Systemic rheumatoid vasculitis in the era of modern immunosuppressive therapy. *Rheumatology* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2018 Sep 19];53(1):145–52. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/ket326>
 144. Staa TP Van, Geusens P, Bijlsma JWJ, Leufkens HGM, Cooper C. Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006 Oct [cited 2018 Sep 19];54(10):3104–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009229>

145. Gough AK, Lilley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1994 Jul 2 [cited 2018 Sep 19];344(8914):23–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912297>
146. Halla JT, Koopman WJ, Fallahi S, Oh SJ, Gay RE, Schrohenloher RE. Rheumatoid myositis. Clinical and histologic features and possible pathogenesis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1984 Jul [cited 2018 Sep 19];27(7):737–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378209>
147. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2002 Sep [cited 2018 Sep 19];46(9):2294–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355476>
148. Simon TA, Thompson A, Gandhi KK, Hochberg MC, Suissa S. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2018 Sep 19];17(1):212. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26271620>
149. Liu X, Loughran TP. The spectrum of large granular lymphocyte leukemia and Felty's syndrome. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2018 Sep 19];18(4):254–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546829>
150. Kelly C, Baird G, Foster H, Hosker H, Griffiths I. Prognostic significance of paraproteinaemia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1991 May [cited 2018 Sep 19];50(5):290–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2042982>
151. Hickson LJ, Crowson CS, Gabriel SE, McCarthy JT, Matteson EL. Development of Reduced Kidney Function in Rheumatoid Arthritis. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Sep 19];63(2):206–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100126>
152. Yunt ZX, Solomon JJ. Lung Disease in Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* [Internet]. 2015 May [cited 2018 Sep 19];41(2):225–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836639>
153. Corrao S, Messina S, Pistone G, Calvo L, Scaglione R, Licata G. Heart involvement in Rheumatoid Arthritis: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2018 Sep 19];167(5):2031–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703938>
154. Sen D, González-Mayda M, Brasington RD. Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* [Internet]. 2014 Feb [cited 2018 Sep 19];40(1):27–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268008>
155. Pincus T, Sokka T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care [Internet]. Vol. 17, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Baillière Tindall; 2003 [cited 2018 Jun 25]. p. 753–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694203000779>
156. Fried BJ, Boers M, Baker PR. A method for achieving consensus on rheumatoid arthritis outcome measures: the OMERACT conference process. *J Rheumatol* [Internet]. 1993 Mar [cited 2018 Jul 6];20(3):548–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478870>
157. van der Heijde DM, van 't Hof M, van Riel PL, van de Putte LB. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol* [Internet]. 1993 Mar [cited 2018 Jul 6];20(3):579–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478878>
158. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LHD, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2011 Mar

- [cited 2018 Sep 22];63(3):573–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294106>
159. STEINBROCKER O, TRAEGER CH, BATTERMAN RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1949 Jun 25 [cited 2018 Jul 6];140(8):659–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18150288>
 160. Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* [Internet]. 1977 Jul [cited 2018 Sep 20];18(4):481–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/920239>
 161. Ravindran V, Rachapalli S. An overview of commonly used radiographic scoring methods in rheumatoid arthritis clinical trials. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2011 Jan 21 [cited 2018 Sep 20];30(1):1–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10067-010-1554-8>
 162. Østergaard M, Peterfy C, Conaghan P, McQueen F, Bird P, Ejbjerg B, et al. OMERACT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core set of MRI acquisitions, joint pathology definitions, and the OMERACT RA-MRI scoring system. *J Rheumatol* [Internet]. 2003 Jun [cited 2018 Sep 20];30(6):1385–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12784422>
 163. Iagnocco A, Naredo E, Wakefield R, Bruyn GAW, Collado P, Jousse-Joulin S, et al. Responsiveness in Rheumatoid Arthritis. A Report from the OMERACT 11 Ultrasound Workshop. *J Rheumatol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2018 Sep 21];41(2):379–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24241482>
 164. Bruce B, Fries JF. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* [Internet]. [cited 2018 Jun 23];23(5 Suppl 39):S14-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273780>
 165. Pincus T, Summey JA, Soraci SA, Wallston KA, Hummon NP. Assessment of patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1983 Nov [cited 2018 Jul 6];26(11):1346–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639693>
 166. Pincus T, Swearingen CJ, Bergman M, Yazici Y. RAPID3 (Routine Assessment of Patient Index Data 3), a rheumatoid arthritis index without formal joint counts for routine care: Proposed severity categories compared to disease activity score and clinical disease activity index categories. *J Rheumatol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2018 Jun 23];35(11):2136–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793006>
 167. Pincus T, Swearingen CJ, Bergman MJ, Colglazier CL, Kaell AT, Kunath AM, et al. RAPID3 (Routine Assessment of Patient Index Data) on an MDHAQ (Multidimensional Health Assessment Questionnaire): Agreement with DAS28 (Disease Activity Score) and CDAI (Clinical Disease Activity Index) activity categories, scored in five versus more than ninety seconds. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2010 Feb [cited 2018 Jun 23];62(2):181–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20191516>
 168. Singh H, Gupta V, Ray S, Kumar H, Talapatra P, Kaur M, et al. Evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis by Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID3) and its correlation to Disease Activity Score 28 (DAS28) and Clinical Disease Activity Index (CDAI): an Indian experience. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2018 Jun 23];31(12):1663–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983768>
 169. Smolen JS. Treat-to-target as an approach in inflammatory arthritis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2016 May [cited 2018 Sep 22];28(3):297–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27027815>
 170. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2016 Aug [cited

- 2018 Sep 22];75(8):1479–85. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26420577>
171. van Nies JAB, Krabben A, Schoones JW, Huizinga TWJ, Kloppenburg M, van der Helm-van Mil AHM. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 May [cited 2018 Sep 23];73(5):861–70. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572339>
 172. Cutolo M, Spies CM, Buttgereit F, Paolino S, Pizzorni C. The supplementary therapeutic DMARD role of low-dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2014 Nov 13 [cited 2018 Sep 23];16(Suppl 2):S1. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608624>
 173. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2016 Jan [cited 2018 Sep 23];68(1):1–25. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26545825>
 174. Nam JL, Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Takase K, Leon-Garcia M, Emery P, et al. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2014 Mar [cited 2018 Sep 24];73(3):516–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399231>
 175. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2017 Jun [cited 2018 Sep 24];76(6):960–77. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264816>
 176. Bingham SJ, Buch MH, Tennant A, Emery P. The impact of escalating conventional therapy in rheumatoid arthritis patients referred for anti-tumour necrosis factor-alpha therapy. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2004 Mar [cited 2020 Mar 11];43(3):364–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657509>
 177. Van Der Heijde D, Klareskog L, Rodriguez-Valverde V, Codreanu C, Bolosiu H, Melo-Gomes J, et al. Comparison of etanercept and methotrexate, alone and combined, in the treatment of rheumatoid arthritis: Two-year clinical and radiographic results from the TEMPO study, a double-blind, randomized trial. *Arthritis Rheum*. 2006 Apr;54(4):1063–74.
 178. Genovese MC, Becker J-C, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, et al. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition.[erratum appears in *N Engl J Med*. 2005 Nov 24;353(21):2311]. *N Engl J Med*. 2005 Sep 15;353(11):1114–23.
 179. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006 Sep;54(9):2793–806.
 180. Emery P, Keystone E, Tony HP, Cantagrel A, Van Vollenhoven R, Sanchez A, et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: Results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2008 Nov;67(11):1516–23.
 181. Kearsley-Fleet L, Davies R, De Cock D, Watson KD, Lunt M, Buch MH, et al. Biologic refractory disease in rheumatoid arthritis: Results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018 Jul 6;

182. Buch MH. Defining refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018 Jul 1;77(7):966–9.
183. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* [Internet]. 1994 [cited 2022 Jul 29];43(1):18–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8023317/>
184. Abdel-Nasser AM, Rasker JJ, Valkenburg HA. Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 1997 [cited 2022 Jun 6];27(2):123–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9355210/>
185. Yuan S, Chen D, Xiao Y, Lao M, Qiu Q, Liang L, et al. Factors Associated with Erosive Arthritis in Rheumatoid Arthritis and Other Connective Tissue Diseases: A Retrospective Study From a Southern Chinese Population. *J Clin Rheumatol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Mar 29];22(1):22–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26693623/>
186. Amaya-Amaya J, Calixto OJ, Saade-Lemus S, Calvo-Paramo E, Mantilla RD, Rojas-Villarraga A, et al. Does non-erosive rheumatoid arthritis exist? A cross-sectional analysis and a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2015 Apr 1;44(5):489–98.
187. Zlatanović G, Veselinović D, Cekić S, Živković M, Dordević-Jocić J, Zlatanović M. Ocular manifestation of rheumatoid arthritis-different forms and frequency. *Bosn J basic Med Sci* [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 29];10(4):323–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21108616/>
188. Cheng TT, Yu SF, Su FM, Chen YC, Su BYJ, Chiu WC, et al. Anti-CCP-positive patients with RA have a higher 10-year probability of fracture evaluated by FRAX®: a registry study of RA with osteoporosis/fracture. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2018 Jan 30 [cited 2022 May 23];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382355/>
189. Esposito AJ, Chu SG, Madan R, Doyle TJ, Dellaripa PF. Thoracic Manifestations of Rheumatoid Arthritis. *Clin Chest Med* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 May 23];40(3):545–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31376890/>
190. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 May 23];42(25):2439–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34120177/>
191. Turesson C, Matteson EL. Vasculitis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 May 23];21(1):35–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19077716/>
192. Steiner G, Smolen J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res* [Internet]. 2002 [cited 2022 Jul 22];4 Suppl 2(Suppl 2):S1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12110150/>
193. Bijlsma JWJ, Van Der Goes MC, Hoes JN, Jacobs JWJ, Buttgereit F, Kirwan J. Low-dose glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: an obligatory therapy. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 22];1193:123–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20398017/>
194. Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 22];64(5):625–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473917/>
195. Ebina K, Hashimoto M, Yamamoto W, Hirano T, Hara R, Katayama M, et al. Drug tolerability and reasons for discontinuation of seven biologics in 4466 treatment courses of rheumatoid arthritis—the ANSWER cohort study. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2019

- Apr 11 [cited 2022 Jul 22];21(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6458752/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018070/)
196. Huang C-H, Cong L, Xie J, Qiao B, Lo S-H, Zheng T. Rheumatoid arthritis-associated gene-gene interaction network for rheumatoid arthritis candidate genes. *BMC Proc* [Internet]. 2009 Dec [cited 2022 May 30];3 Suppl 7(Suppl 7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018070/>
 197. Xiao X, Hao J, Wen Y, Wang W, Guo X, Zhang F. Genome-wide association studies and gene expression profiles of rheumatoid arthritis: An analysis. *Bone Joint Res* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 May 30];5(7):314–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27445359/>
 198. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P, Fuchs EJ, Luznik L, Huang XJ, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jun 6];55(1):12–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30833742/>
 199. Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP, Takahashi Y, et al. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2022 Jun 6];104(1):170–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15016654/>
 200. Aghaei H, Mostafaei S, Aslani S, Jamshidi A, Mahmoudi M. Association study between KIR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: an updated meta-analysis. *BMC Med Genet* [Internet]. 2019 Jan 29 [cited 2022 May 30];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30696403/>
 201. Heatley SL, Mullighan CG, Doherty K, Danner S, O'Connor GM, Hahn U, et al. Activating KIR Haplotype Influences Clinical Outcome Following HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *HLA* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Jun 6];92(2):74–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29943500/>
 202. Stringaris K, Marin D, Barrett AJ, Hills R, Sobieski C, Cao K, et al. KIR gene haplotype: an independent predictor of clinical outcome in MDS patients. *Blood* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2022 Jun 6];128(24):2819–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27760759/>
 203. Traherne JA, Jiang W, Valdes AM, Hollenbach JA, Jayaraman J, Lane JA, et al. KIR haplotypes are associated with late-onset type 1 diabetes in European-American families. *Genes Immun* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Jun 6];17(1):8–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26492518/>
 204. Oliveira LM, Portela P, Merzoni J, Beppler J, Dias FS, Graebin P, et al. KIR gene haplotype A is associated with hospital mortality in patients with sepsis. *Clin Immunol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Jun 6];200:37–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30710693/>
 205. Blunt MD, Khakoo SI. Activating killer cell immunoglobulin-like receptors: Detection, function and therapeutic use. *Int J Immunogenet* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jul 22];47(1):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31755661/>
 206. VandenBussche CJ, Mulrooney TJ, Frazier WR, Dakshanamurthy S, Hurley CK. Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. *Genes Immun* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jul 22];10(2):162–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005473/>
 207. Luo L, Du Z, Sharma SK, Cullen R, Spellman S, Reed EF, et al. Chain-terminating natural mutations affect the function of activating KIR receptors 3DS1 and 2DS3. *Immunogenetics* [Internet]. 2007 Oct [cited 2022 Jul 20];59(10):779–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17646980/>

208. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2011 Jan [cited 2022 Jul 22];39(Database issue). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21062830/>
209. Velasco VM, Martínez VA, Roiz J NA. Muestreo y tamaño de muestra: una guía práctica. Mexico. México: E-Libro.net; 2002.

ANEXOS

ANEXO I. APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA.



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/11/2014, acta 11/14 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. Pablo Mesa del Castillo** referida al estudio:

Título: Estudio de factores inmunogenómicos que condicionan la respuesta innata en artropatías

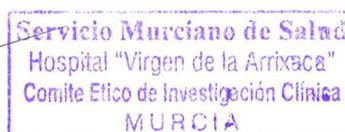
1º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que sea realizado por el **Dr. Pablo Mesa del Castillo Bermejo** como investigador principal en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de noviembre de 2014

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

