



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**FARMACOGENÓMICA EN POBLACIÓN COLOMBIANA
CON ARTRITIS REUMATOIDE**

Yolima Puentes Osorio

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2021

**FARMACOGENÓMICA EN POBLACIÓN COLOMBIANA CON ARTRITIS
REUMATOIDE**

Yolima Puentes Osorio

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesores (a):

Pedro Amariles Muñoz

Beatriz Helena Aristizábal B.

Miguel Ángel Calleja

Línea de Investigación: Atención Farmacéutica

Grupo de Investigación: Promoción y Prevención Farmacéutica

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencia Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2021

Dedicatoria

A las tres personas imprescindibles sin las cuales no habría podido llevar a cabo esta tesis: el Dr. Pedro Amariles Muñoz, por otorgarme la oportunidad de trabajar en el fascinante mundo de la Atención Farmacéutica y comenzar con la Farmacogenómica en esta línea, así como por su tesón, guía y apoyo durante el desarrollo de la investigación; a la Dra. Beatriz Elena Aristizábal, colaboradora, amiga, guía y apoyo durante el desarrollo del proyecto, además de ejemplo de esfuerzo, dinamismo, entusiasmo y trabajo, enseñándome que no existen metas inalcanzables cuando se hacen las cosas con ilusión y amor. Al Dr. Miguel Ángel Calleja por su siempre buena disposición, interés y su inestimable ayuda internacional, logrando que esta tesis pueda ser, hoy, presentada a la Universidad de Antioquia.

A los Dres. Luis Fernando Pinto, Andrés Echeverry, Deisy Pineda y Clara Aristizabal por su ayuda y consejo en el trabajo de campo con los pacientes vinculados a la investigación. A Artmédica, Hospital Pablo Tobón Uribe en Medellín Colombia, al Hospital Universitario Virgen de la Macarena en Sevilla, España; así como a todos los médicos reumatólogos y químicos farmacéuticos por su ayuda desinteresada en la recogida de datos, desarrollo de artículos y explicación de la investigación a los pacientes.

A Unigem, por su paciencia y arduo trabajo en el laboratorio, ofreciendo siempre una sonrisa y buena disposición. A los Doctores Vicente Merino, Manolo Cameahn, por su direccionamiento y apoyo durante la pasantía internacional; así como a todos los compañeros del Grupo de promoción y prevención farmacéutica de la Universidad de Antioquia en especial Johan Granados, Mauricio Ceballos, Andrea Salazar, Jaime Alejandro Hincapié quienes me orientaron en los seminarios semanales y a los compañeros de Duponte Carlos Rodríguez, Javier Barrera, Estefanía Posada, Camila Puentes Silva, por sus aportes en la fase final del trabajo. Por su apoyo permanente

e incondicional desde el inicio de la investigación a Carlos Andrés Castellanos Rivera y a mi gran amigo Edwing Amir Moreno quien ahora nos acompaña desde el cielo.

Por último, a las personas que me han permitido alcanzar mis sueños en la vida y llegar a donde me encuentro hoy día: mis padres, Álvaro Puentes y Gloria Osorio, por su apoyo incondicional y confianza plena; a mis hermanos Federico, Álvaro, Bárbara, Leonor, Gloria, Carmen, José, por sus constantes palabras de ánimo y enseñarme que siempre caminaremos juntos; a mis sobrinos Yesica, Camila, Carlos Andrés por sus consejos y ayuda durante la investigación; y un agradecimiento especial a mi hermana Leonor Puentes por su apoyo, guía, ejemplo, amor, dedicación enseñándome a lograr mis sueños con constancia y disciplina; finalmente, a Pilar de la Rosa por su amistad, cariño, apoyo permanente y a mi esposo, mi compañero de viaje en la vida, Eugenio Escribano, por demostrarme cada día que ha sido la mejor elección que jamás podría haber hecho y querer seguir construyendo conmigo muchos más planes de futuro.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema, hipótesis y pregunta de investigación	1
1.1.1. Problemática frente a la variabilidad genómica y la respuesta a medicamentos	1
1.1.2. Problemática frente al fallo terapéutico en Artritis Reumatoide	2
1.1.3. Problemática farmacogenómica y fallo terapéutico en AR	3
1.1.4. Hipótesis	4
1.1.5. Pregunta de investigación	4
1.2. Justificación	4
1.2.1. Relevancia y pertinencia social	5
1.2.2. Aporte teórico y Metodológico	5
1.2.3. Viabilidad y factibilidad	6
1.2.4. Relación con políticas públicas	7
1.3. Objetivos	7
1.3.1. Objetivo General	7
1.3.2. Objetivos Específicos	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Farmacogenómica en la AR	8
2.2. Definición de artritis reumatoide	9
2.3. Epidemiología	9
2.4. Fisiopatología AR	10
2.5. Diagnóstico	15
2.6. Presentación Clínica	17
2.7. Tratamiento farmacológico en la artritis reumatoide	17
2.8. Mecanismo de acción fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME):	18
2.9. Mecanismo de acción inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (Anti-TNF α)	20
2.10. Efectividad de los fármacos Anti TNF	22
2.11. Variabilidad en la respuesta a Fármacos Anti TNF	23
2.12. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide en el tratamiento con Inhibidores del Factor de Necrosis Tumoral alfa, Anti-TNF	24

2.13. Biomarcadores en artritis reumatoide	30
2.13.1 Definición biomarcadores	30
2.13.2. Biomarcador Ideal	31
2.13.3 Utilidad Clínica de los Biomarcadores en la Artritis Reumatoide	32
3. METODOLOGÍA	36
3.1 Diseño de estudio	36
3.1.1. Tipo de estudio casos y controles	36
3.2 Población de estudio	37
3.3 Criterios de inclusión y exclusión	37
3.3.1 Criterios de inclusión:	38
3.3.2 Criterios de exclusión	38
3.4 Variables de estudio	38
3.5 Reclutamiento y recolección de datos	39
3.6 Análisis estadístico	42
3.7 Limitaciones y sesgo potencial	42
3.8 Técnicas de procesamiento	43
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	49
4.1 Resultados frente a la determinación de variantes genómicas en pacientes colombianos con AR y análisis de su asociación con fallo terapéutico a Adalimumab en monoterapia o terapia combinada.	49
4.2. Resultados frente a la identificación de variantes genómicas conocidas y no conocidas mediante secuenciación de próxima generación en pacientes colombianos con AR.	52
4.2.1. Genotipificación de las muestras en los genes de interés	52
4.2.2. Análisis de Datos Bioinformáticos	53
4.2.3. Análisis genes de AR y función del TNF	54
4.2.4. Análisis genotipificación de las muestras en las variantes de interés	55
4.3. Establecer la asociación de variantes genómicas identificadas con el fallo terapéutico a Adalimumab en pacientes colombianos con AR	56
4.4 Resultados frente al diseño de una base de datos integral de variantes genómicas en pacientes colombianos con artritis reumatoide identificando posibles biomarcadores en los estudios bioinformáticos	57
4.4.1 Estudio de factores genéticos de susceptibilidad	57
4.4.2. Análisis Funcional	61
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

67

7. REFERENCIAS

68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Criterios ACR/EULAR para diagnóstico de AR (A., 2011)

Tabla 2: Especificaciones parámetros panel de secuenciación diseñado.

Tabla 3: Características demográficas de los pacientes con AR

Tabla 4: Emparejamiento casos y controles

Tabla 5: Listado de genes candidatos

Tabla 6: Variantes con los OR más altos de fallo terapéutico

Tabla 7: Cálculo riesgo AR

Tabla 8: Score de Riesgo vs Fallo terapéutico

Tabla 9: Significancia de correlación fallo terapéutico

Tabla 10: Evidencia de eficacia relacionada con el Adalimumab el el rs 1800629

Tabla 11: Listado de genes candidatos y de genes de las variantes secuenciadas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatología de la Artritis Reumatoide Imagen

Figura 2: Activación Inflamatoria.

Figura 3: Presentación antigénica y citoquina proinflamatorias. Elaboración Propia.

Figura 4: Susceptibilidad genética en AR

Figura 5: Citocina TNF e IL6 en la AR

Figura 6: FARME aprobados para el tratamiento de la artritis reumatoide

Figura 7: Mecanismo de acción del metotrexato

Figura 8: Estadío de AR, fases y biomarcadores

Figura 9: Reclutamiento Casos y Controles

Figura 10: Panel de Secuenciación. Extraído Software Desig Illumina

Figura 11: Amplicones Panel de Secuenciación

Figura 12: Población de estudio y variantes asociadas con fallo terapéutico

Figura 13: Variantes con scores más altos

Figura 14: Lista de estudios en la plataforma.

Figura 15: Gráfico de dispersión de variantes

Figura 16: Score entre Casos y Controles de Fallo Terapéutico

GLOSARIO

ACPA: Anticuerpos Antipéptidos Cíclicos Citrulinados

ACR: American College of Rheumatology

ADA: Adalimumab

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos

ADN DNA: ácido desoxiribonucleico

AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxy

AINES: Antiinflamatorios No Esteroideos

AMPK: AMP-activated protein kinase

AMP: Adenosín monofosfato cíclico

AR: Artritis Reumatoide

BRASS: Brigham and Women's Hospital Rheumatoid Arthritis Sequential Study

Chr: cromosoma

DHFR: dihidrofolato reductasa

EA: ensayos aleatorios

ECA: ensayos clínicos controlados aleatorios

EII: enfermedades inflamatorias del intestino

ESR: erythrocyte sedimentation rate

VSG: velocidad de sedimentación globular

ETN: Etanercept

EULAR: European League Against Rheumatism

FARMES o DMARD: Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad

HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IFX: Infliximab

IL: Interlequina

IgGs: Inmunoglobulina G

INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia y Control de Medicamentos y Alimentos

IPS: Institución Prestadora de Servicios de Salud

LDL: lipoproteínas de baja densidad

GWAS: estudio de asociación del genoma completo

NK: células denominadas *Natural killer*

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MTX: Metotrexato

OR: Odds Ratio

PCR: Proteína C Reactiva

RAM: Reacciones Adversas a los Medicamentos

RASFs: Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

RF: Factor Reumatoide

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VNTR: Polimorfismos en el número de repeticiones en tándem

RESUMEN

La farmacogenómica es la ciencia que estudia la variabilidad genética de un individuo en respuesta a un fármaco específico, es decir, cada paciente o individuo expuesto a fármacos responderá de forma diferente a un tratamiento. Esta variación en la respuesta se presenta dadas las diferencias interindividuales. Los principales problemas de la población con artritis reumatoide (AR) están relacionados con los problemas de eficacia y seguridad que surgen durante el seguimiento farmacoterapéutico de la AR.

Actualmente, existen estudios limitados sobre la farmacogenómica poblacional y no existen estudios en población colombiana; por ello, es necesario identificar y clasificar variantes genéticas propias, en pacientes colombianos con AR, contribuyendo así a la medicina de precisión.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación de polimorfismos genéticos con la respuesta al inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) adalimumab. Esta investigación es un estudio prospectivo observacional de casos y controles en pacientes con tratamiento de adalimumab en monoterapia o terapia combinada. Se utilizó la técnica de secuenciación Truseq Custom Amplicón para el descubrimiento de variantes. El protocolo del ensayo se registró en ClinicalTrials.gov (Identificador NCT03352622)

El resultado fue la identificación de la variante del gen FcGR2B SNP rs6666965 en pacientes con fallo terapéutico a adalimumab. Esta identificación contribuirá a la realización de nuevas investigaciones, al desarrollo de pruebas farmacogenéticas para Adalimumab antes de su uso y a generar una base farmacogenómica para la población colombiana con AR

Palabras Clave: Farmacogenómica, Polimorfismos de un solo nucleótido, Medicina de Precisión, Fallo terapéutico, Inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa

ABSTRACT

Pharmacogenomics is the science that studies the genetic variability of an individual in response to a specific drug. Thus, each patient or individual exposed to drugs will respond differently to a treatment. This type of variation corresponds to interindividual differences. The major problems about Rheumatoid Arthritis's (RA) pharmacogenomics population are related to effectiveness and security issues that arise during pharmacotherapeutic follow-up to RA.

Currently, there are limited studies on the population's pharmacogenomics and there are no studies in the Colombian population; thus, it is necessary to identify and classify own genetic polymorphisms in Colombian patients with RA and contribute to medical precision

The purpose of the present article was to determine the association of genetic polymorphisms with the response to the tumor necrosis factor-alpha (TNF α) inhibitor adalimumab. This research is a prospective observational case-control study in patients with treatment of adalimumab in monotherapy or combination therapy. The trial protocol is registered in ClinicalTrials.gov (Identifier NCT03352622).

The result was the identification of FcGR2B SNP rs6666965 in patients with ineffectiveness to adalimumab. This identification will contribute to increasing success rates of pharmacogenetics tests for Adalimumab and the generation of a pharmacogenomics basis for RA's population.

Keywords: Pharmacogenomics, Single nucleotide polymorphisms, Precision Medicine, ineffectiveness, Tumor necrosis factor alpha inhibitor

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema, hipótesis y pregunta de investigación

1.1.1. Problemática frente a la variabilidad genómica y la respuesta a medicamentos

Los seres humanos presentan variación genética por las diferencias en su secuencia de ADN, lo que conlleva a que la capacidad de respuesta y toxicidad a los fármacos sea diferente en cada individuo de la población. (Caskey, 2010) (Venter., 2000) La disciplina que estudia dicha variabilidad genética, a nivel individual, en respuesta a un fármaco es denominada Farmacogenética y la que, además incluye las variables ambientales en la misma, se le llama Farmacogenómica (Howard L McLeod, 2001) (Rae.). Estas disciplinas tienen utilidad en la práctica clínica para predecir la respuesta individual de los pacientes a los diferentes fármacos, en especial para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (Smolen, 2018).

De acuerdo con diferentes reportes, los medicamentos son efectivos en un rango que oscila entre 25% a 60% (Oscar Arturo Prior-González, 2011), es decir que el fallo terapéutico se presenta hasta en un 75%, es por ello que se ha estudiado la variabilidad en la respuesta por adherencia, por acceso, por interacciones con fármacos o alimentos, pero, los estudios relacionados con la variabilidad en la respuesta por factores genéticos son limitados. La variabilidad genética se asocia en un 90% a los Polimorfismos de un solo nucleótido SNPs, implicados en la farmacocinética y/o la farmacodinamia de los fármacos utilizados en los diferentes tratamientos, afectando así la eficacia y seguridad (Tanaka E1, 2004). La farmacogenómica favorece una comprensión mejor de los mecanismos biológicos y, con ello, el desarrollo de modelos clínicos que predicen el fármaco con el mayor beneficio en cada paciente.

1.1.2. Problemática frente al fallo terapéutico en Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, heterogénea, crónica, que produce inflamación en la membrana sinovial, cartílago y hueso. (Darren & Rielly, 2010) (Colciencias., 2016) De acuerdo con la Guía 26 para la Detección Temprana, Diagnóstico y Tratamiento de la Artritis Reumatoide de Colombia del año 2014 (Colciencias., 2016), la Artritis reumatoide, en estudios poblacionales en diferentes países, ha mostrado una prevalencia general entre 0,5% y 1%. Por su parte, en el censo del año 2005 en Colombia se reportaron 200.000 pacientes con AR, incluida la población juvenil (Colciencias., 2016).

En Colombia, la Artritis Reumatoide es una enfermedad de alto costo (Cuenta de alto costo: Fondo colombiano de enfermedades de alto costo, 2020) y el 86% de los recursos invertidos en su tratamiento corresponde a medicamentos. (Claudia Mora, 2009) (Gallardo-Solarte K, 2016) De acuerdo con el reporte del Instituto Nacional de Vigilancia y Control de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), en su programa nacional de farmacovigilancia en el Boletín FarmaSeguridad de Febrero 2016, “la Artritis Reumatoide es el segundo diagnóstico con más reportes de Fallos Terapéuticos los cuales se definen como la falta inesperada de la respuesta de un medicamento” (INVIMA, 2016); por su parte en España entre los 3 y 5 años de tratamiento, entre el 40 y el 60% de los pacientes ha tenido que suspender el tratamiento, principalmente por motivos de falta de eficacia (Balsa, 2011).

Para los pacientes con AR, actualmente se recomienda en Colombia, instaurar un tratamiento inicial con fármacos modificadores de la enfermedad (FARME), siendo el metotrexato el tratamiento de elección. Para los pacientes que no responden de manera satisfactoria al tratamiento con metotrexato, los inhibidores del TNF- α (infiximab, adalimumab o etanercept), generalmente combinados con metotrexato, se consideran de segunda línea. El rituximab y el abatacept, que actúan sobre los linfocitos B y T respectivamente, están aprobados como tratamientos de tercera línea; por su parte el tocilizumab (anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor de la interleucina IL 6), está aprobado para el tratamiento de la AR activa moderada o grave en pacientes adultos con respuesta insuficiente o intolerancia a un tratamiento previo con uno o más FARME o con un anti-TNF- α , en combinación con metotrexato (Colciencias., 2016).

De acuerdo con lo anterior los anti-TNF, tienen un alto uso en la práctica clínica, en especial Adalimumab; se ha confirmado en múltiples ensayos clínicos, registros de pacientes y meta análisis que una proporción significativa de pacientes tiene que suspender el tratamiento con anti-TNF debido a una respuesta insuficiente, ya que la remisión se alcanza en tan sólo 20 o 30% de los pacientes (Balsa, 2011) (F.C. Breedveld, 2006) (St Clair EW, 2004) (Klareskog L, 2004).

Una revisión sistemática del *International Journal of Rheumatology* en el 2013, reporta que aproximadamente el 50% de los pacientes con AR en Europa interrumpen su inhibidor de TNF- α , durante los primeros cinco años como consecuencia de la ineficacia o de reacciones adversas al medicamento (Arora, 2013). De forma similar, un estudio en Boston en el BRASS (Brigham and Women 's Hospital Rheumatoid Arthritis Sequential Study) reportó que el 42% de los pacientes con AR informaron del abandono de su tratamiento anti-TNF- α . (AGARWAL, 2008). En este contexto, el elevado número de pacientes que suspenden el tratamiento con anti-TNF- α disminuye la generación de información que mejore la capacidad de predecir qué pacientes responderán a las terapias específicas.

De acuerdo con los párrafos anteriores, en el tratamiento farmacoterapéutico de la Artritis Reumatoide en Colombia, Europa y Estados Unidos se han reportado fallos terapéuticos; estos problemas de efectividad podrían estar asociados a la variabilidad genética de cada paciente, incluyendo las variables ambientales, las cuales se expresan en un 90% por polimorfismos genéticos.

1.1.3. Problemática farmacogenómica y fallo terapéutico en AR

En una revisión estructurada realizada al inicio del proyecto (Puentes Osorio Y, 2018) se encontró que a nivel mundial, existen limitados estudios sobre farmacogenómica y no se encontraron estudios farmacogenómicos en la población colombiana con AR, por lo que se hace necesario identificar y clasificar las variantes genómicas, en especial, polimorfismos genéticos propios de pacientes colombianos con AR que influyen en la respuesta a los medicamentos más utilizados en la práctica, como es el caso de Adalimumab. De esta manera es posible contribuir a una mejor atención en salud, teniendo en cuenta el genoma característico de cada paciente con AR.

La presente investigación, busca determinar la asociación de variantes genómicas con el fallo terapéutico (variable de interés) a inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), mediante un estudio prospectivo de casos y controles con uno de los anti TNF más utilizados Adalimumab, además de contribuir con información genómica para la realización de test genéticos específicos para la AR y a la generación de una base farmacogenómica de la población colombiana con AR.

1.1.4. Hipótesis

En pacientes colombianos con artritis reumatoide, algunas variantes genómicas (SNP) pueden asociarse con el fallo terapéutico al Anti TNF Adalimumab

1.1.5 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las variantes genómicas (SNP) de pacientes colombianos con Artritis Reumatoide que están asociados al fallo terapéutico del Anti TNF α Adalimumab?

1.2. Justificación

La Artritis Reumatoide constituye un importante problema de salud pública; en los últimos años se han logrado mejores resultados de salud con la incorporación de medicamentos modificadores de la enfermedad sintéticos y biológicos. Sin embargo, se reportan problemas de variabilidad en la respuesta lo que conlleva al fallo terapéutico de anti TNF en un 70 a 80% (Balsa, 2011) (St Clair EW, 2004). En este sentido, la farmacogenómica, a través del estudio de variantes genéticas de proteínas involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos (Andrés, 2010), se convierte en una forma de maximizar la eficacia de la farmacoterapia con el anti TNF Adalimumab.

Este trabajo pretende dar una visión general de la farmacogenómica de la artritis reumatoide y la posibilidad de utilizar, en la consulta clínica, herramientas genéticas para apoyar la decisión farmacoterapéutica con el objeto de minimizar el fallo terapéutico a Adalimumab. Además, es importante mencionar que en el contexto de Colombia hay información limitada de farmacogenómica, especialmente en paciente con artritis reumatoide, por tanto este trabajo es uno de los primeros que aporta información sobre la variabilidad farmacológica en el país asociada a variantes genéticas. La información se generó utilizando técnicas de secuenciación de descubrimiento que permiten identificar variantes no conocidas.

1.2.1. Relevancia y pertinencia social

El trabajo es relevante, aportando información farmacogenómica, que no se había identificado en población colombiana, como es el caso de las variantes genómicas asociadas con el fallo terapéutico a Adalimumab en pacientes con AR.

La pertinencia social, está dada por información generada que contribuye a mejorar las condiciones de salud de la población con AR, ya que puede ser utilizada para crear una estrategia de identificación de variantes genómicas asociadas a fallo terapéutico de Adalimumab, la cual contribuye a predecir el riesgo de fallo terapéutico por factores genéticos logrando identificar los casos en los cuáles no debería utilizarse este medicamento

1.2.2. Aporte teórico y metodológico

El aporte teórico de este estudio consiste en descubrir las variantes genómicas en pacientes colombianos con AR que podrían estar asociadas con el fallo terapéutico al anti TNF Adalimumab y así brindar la posibilidad de aplicar la investigación de genes candidatos, seleccionados por su importancia biológica, ya sea en la cinética o por su relación en la acción farmacológica, en la identificación de individuos con riesgo de experimentar fallo terapéutico. Por ello, se espera que

la información generada sea susceptible de ser utilizada en práctica clínica diaria, contribuyendo a identificar la mejor opción terapéutica (mayor efectividad) en pacientes con artritis reumatoide.

El aporte metodológico en el desarrollo de investigaciones de descubrimiento de nuevas variantes genómicas y su asociación con el fallo terapéutico a medicamentos, optimizando los recursos de investigación que son limitados y siendo muy exigentes con las medidas de asociación entre exposición y resultado, a la vez que se minimizan confusores. Este tipo de estudio de casos y controles prospectivo en la identificación de variantes genómicas y retrospectivo en el fallo terapéutico a Adalimumab, puede ser utilizado como referente para investigación de fallo terapéutico por variabilidad genética en otros medicamentos y para el descubrimiento de variantes genómicas en población colombiana, cuya información es limitada, dados los altos costos de la secuenciación para este tipo de identificación.

1.2.3. Viabilidad y factibilidad

Desde el inicio el proyecto de investigación fue viable pues se contó con el apoyo de Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud para la vinculación de pacientes con AR a la investigación, se logró la aprobación del comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe, se vinculó al proyecto el Laboratorio Unigem que contaba con el equipo de secuenciación para descubrimiento de variantes genómicas, se realizó una revisión estructurada en donde se encontraron estudios farmacogenómicos de identificación de variantes, gracias a los cuales hoy en la práctica clínica se detectan variantes genéticas antes de prescribir ciertos medicamentos, lo cual podría aplicarse para la AR y los Anti TNF en pacientes colombianos con AR.

La factibilidad de este estudio al inicio se vio afectada pues se esperaba incluir en el estudio pacientes con varios Anti TNF y secuenciar más de 140 pacientes, para ello se contaba con recursos aportados por Minciencias en la convocatoria 727 que tan sólo cubrían un 20% del valor requerido; por tanto, para lograr la factibilidad del proyecto, se decidió enfocarse únicamente en el anti TNF más utilizada en ese momento y Unigem apoyó el proyecto cobrando únicamente los reactivos; por lo anterior, el protocolo de investigación fue actualizado en el comité de ética del

hospital y se enfocó la investigación en el anti TNF Adalimumab, garantizando así la factibilidad del proyecto al contar con todos los recursos para el desarrollo del mismo.

1.2.4. Relación con políticas públicas

Desde la política pública el contar con test predictores de respuesta a medicamentos, favorece establecer estrategias para incluir el análisis de variantes genómicas en la población y buscar el logro de la remisión clínicas en especial en pacientes con AR, de esta manera se contribuye a mejorar la pérdida de oportunidades terapéuticas en pro de la calidad de vida de los pacientes.

Adicionalmente, se espera que este tipo de información contribuya a optimizar los costos de atención en esta enfermedad, la cual es clasificada, en Colombia, como una patología de alto costo.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar variantes genómicas en pacientes colombianos con AR y analizar su asociación con fallo terapéutico a Adalimumab en monoterapia o terapia combinada.

1.3.2. Objetivos Específicos

✓ Identificar variantes genómicas conocidas y no conocidas mediante secuenciación de próxima generación en pacientes colombianos con AR.

✓ Establecer la asociación de variantes genómicas identificadas con el fallo terapéutico a Adalimumab en pacientes colombianos con AR

✓ Diseñar una base de datos integral de variantes genómicas en pacientes colombianos con artritis reumatoide identificando posibles biomarcadores en los estudios bioinformáticos

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Farmacogenómica en la AR

La farmacogenómica, definida como el estudio de las influencias genéticas en respuesta a medicamentos (Ritter, 2020), ha sido objeto de múltiples investigaciones en los últimos años, dichas investigaciones han tenido como fin “identificar variantes génicas o productos génicos que pueden modificar la magnitud del efecto farmacológico y los efectos secundarios e interacciones fármaco-fármaco”, de manera que logran cumplir con el principio que rige esta disciplina, el cual está basado en “definir un tratamiento farmacológico individualizado basado en el perfil genético de cada paciente, convirtiendo el paradigma clásico de tratamiento clínico centrado en la enfermedad en un nuevo enfoque, la medicina personalizada”. (Álvarez, 2018)

Así mismo, la artritis reumatoide (AR), es definida como “una enfermedad autoinmune de características inflamatorias, de naturaleza autoinmune” que afecta en particular, pequeñas articulaciones de las extremidades superiores e inferiores (Camaño, 2020). La terapia más común para esta enfermedad son los fármacos metotrexato (MTX) e inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (Anti TNF), los cuales logran reducir la inflamación y la progresión de la enfermedad; no obstante, se identifica una problemática relacionada con el fallo terapéutico a estos tratamientos convencionales. (Zhang, 2020)

Dicho lo anterior, es evidente la relación estrecha entre la farmacogenómica y aquellas enfermedades crónicas como la AR, toda vez que, esta disciplina ha abierto puertas de esperanza en pacientes cuya calidad de vida ha sido reducida grandemente, pues específicamente la AR es causante de dolores intensos asociados a inflamación por desgaste de la membrana sinovial que recubre las articulaciones, conduciendo a la destrucción del cartílago y del hueso yuxtaarticular, ocasionando eventualmente a la deformidad, discapacidad y deterioro de la calidad de vida. (Restrepo, 2016); así mismo, se le han atribuido impactos que abarca la totalidad de órganos y sistemas de órganos del cuerpo humano, cuyas manifestaciones cardiorrespiratorias, dermatológicas, neurológicas y digestivas son las de mayor frecuencia. (Castro, 2019)

De igual manera, es relevante destacar el aporte realizado desde la farmacología, pues ha significado una mejora sustancial a partir del desarrollo de nuevos fármacos; no obstante, “la respuesta no es universal para ninguna de las opciones de tratamiento, y la selección de una terapia eficaz se basa actualmente en un enfoque de prueba y error” (Bluett, 2017); es así como, en los últimos años, las investigaciones se han enfocado en evaluar modelos experimentales aportados por la biotecnología farmacéutica cuyos impactos han sido positivos en la calidad de vida de los pacientes; sin embargo, en ciertos genotipos se han presentado respuestas inmunes no deseadas, ocasionando fallo terapéutico de dichos tratamientos, posiblemente por anticuerpos antidrogas (ADAb). (Reyes, 2017)

2.2. Definición de artritis reumatoide

La AR “es una enfermedad crónica, inflamatoria, de naturaleza autoinmune” (Smolen J. A., 2018), a menudo deshabilitante, que cursa con un patrón de signos clínicos inflamatorios presentados principalmente articulaciones sinoviales. Básicamente se considera una enfermedad de compromiso articular de forma simétrica que en episodios de diagnóstico y tratamiento tardío conlleva a la destrucción de la articulación por medio de la erosión del cartílago y el hueso, causando así deformaciones articulares (Deepali, 2019). A pesar de que la AR se considera como una enfermedad articular, se sugiere que alrededor del 40% de los pacientes que cursan clínicamente con un cuadro de AR llegan a presentar compromiso extra articular con manifestaciones en el sistema músculo esquelético y órganos no articulares tales como piel, ojos, pulmones, corazón, entre otros. (PJW Venables) La AR es causante sustancial de alta morbilidad-mortalidad, reducción de calidad de vida de las personas y aumento de costos anuales de alrededor de un billón de dólares. (Deane, 2020).

2.3. Epidemiología

Existen factores de riesgo que se relacionan en el desarrollo de la AR, algunos de los más comunes incluyen el sexo femenino, consumo de tabaco, microbiota, dieta, etnia y susceptibilidades

genéticas. Se calcula una prevalencia mundial es de 0,5 y 1% en pacientes de raza blanca. (Smolen J. S., 2018)

En Colombia, según la Revista Colombiana de Reumatología, se estimó que entre los años 2012 y 2016 hubo una cantidad de 248.995 casos confirmados de AR, por lo que la prevalencia colombiana es de aproximadamente 0,52%. Esta cifra es concordante con la estimación de prevalencia a nivel mundial. Asimismo, se debe precisar que en el contexto colombiano, la prevalencia de casos se encontraba en estos años en mayor proporción en mujeres (1.21%) que en hombres (0.29%) (Fernández-Ávila, 2019). Durante el periodo del 1 de julio de 2018 y el 30 de junio de 2019 se reportaron 4.766 casos nuevos de AR, de los cuales el 83,93% corresponden a mujeres y el 16,07% a hombres. Para 2019, la prevalencia nacional fue de 0,24. Entre tanto, el 40,09% de los casos incidentes tenía edades comprendidas entre los 50 a 64 años. En los hombres, la mayor frecuencia estuvo entre los 60 a 64 años, mientras que las mujeres entre los 55 a 59 años. El régimen sanitario, con el mayor reporte de casos incidentes de AR fue el contributivo con 2.736 pacientes, seguido por el subsidiado con 1.787, excepción con 218, especial con 19 y no afiliados 6. (Cuenta de alto costo: Fondo colombiano de enfermedades de alto costo) La prevalencia para Bogotá fue de 0,33%, y en Antioquia de 0,49%. (Daniel G. Fernández-Ávila, 2019)

2.4. Fisiopatología AR

Como se observa en la figura 1, la mayoría de pacientes con sospecha de AR, existe un periodo previo al desarrollo de manifestaciones clínicas que se caracteriza por elevaciones sistémicas de anticuerpos relacionados con AR. Este periodo se conoce como Artritis Reumatoide Preclínica (Gary S Firestein & Monica Guma, 2020). En esta fase de la enfermedad se deben tener en consideración los factores de riesgo asociados a susceptibilidad genética que se relacionan en mayor cantidad con los patrones de genes heredados, dentro de los cuales el más importante son los que se encuentran en el Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Gary S Firestein & Monica Guma, 2020). El papel de la epigenética aún no es totalmente comprendido, sin embargo, algunos estresores, como por el ejemplo el tabaquismo, pueden actuar sobre células en tejidos mucosos, promoviendo la conversión post-

transduccional del aminoácido arginina a citrulina en una gran variedad de proteínas donde se incluyen proteínas intracelulares y matrices proteicas por medio de la inducción de las proteína-arginina de iminasas en el proceso de citrulinación. (Evangelatos, 2019)

Después del proceso de citrulinación o las modificaciones post-traduccionales, los péptidos alterados se unen a las proteínas del MHC heterodímeras, específicamente a las que tienen epítopes compartidos, lo que conlleva a la presentación de antígenos a las Linfocitos T y estimulan a las Linfocitos B a la síntesis de anticuerpos que reconocen proteínas propias como por ejemplo el Factor Reumatoide (RF) cuyo objetivo inmunológico son IgGs, y los Anticuerpos Antipéptidos Cíclicos Citrulinados (ACPA) cuyo objetivo inmunológico son las proteínas citrulinadas. (Evangelatos, 2019)

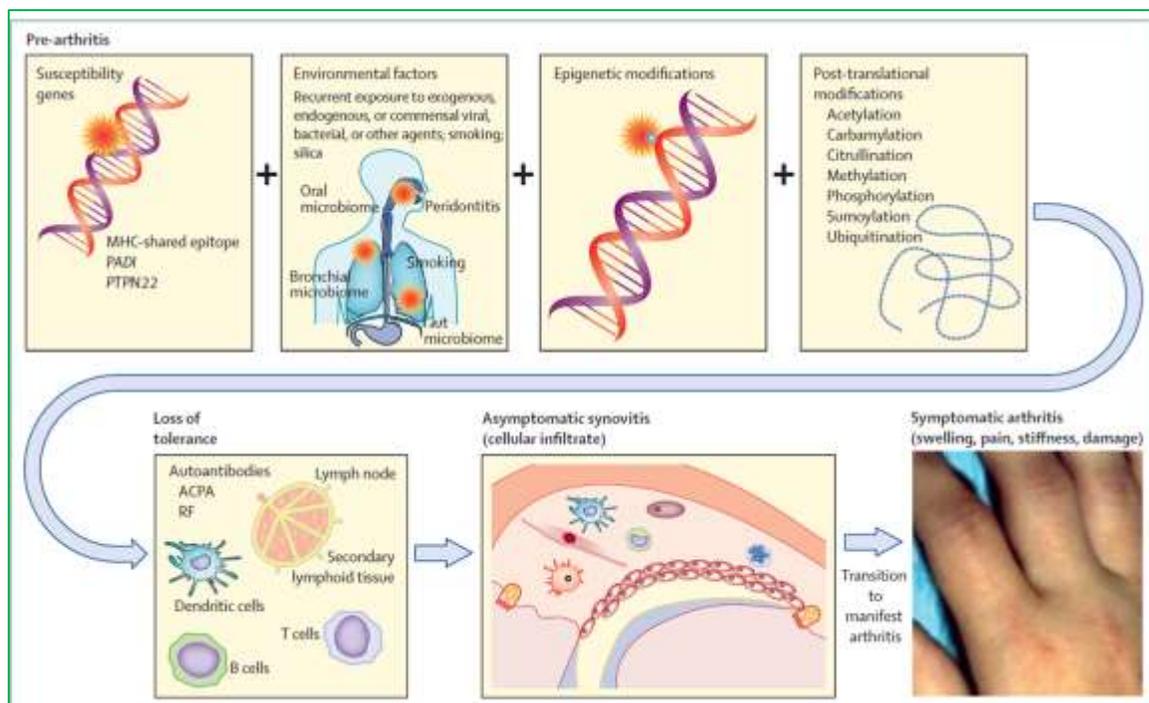


Imagen Tomado de-, Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016 Oct 22;388(10055):2023-2038. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8. Epub 2016 May 3. Erratum in: Lancet. 2016 Oct 22;388(10055):1984. Mateos C. Artritis reumatoide (I). Medicina. 2013;11(30):1841-9

Figura 1: Fisiopatología de la Artritis Reumatoide (Smolen JS, 2016)

Aún se desconocen los estímulos desencadenantes de la respuesta inflamatoria sistémica inespecífica, pero, la manifestación inflamatoria sinovial se encuentra relacionada mayoritariamente a la infiltración de células con respuesta inflamatoria como lo son los Linfocitos T, Linfocitos B y macrófagos, que conlleva a la degradación de cartílagos y huesos comprometidos.

Probablemente las Linfocitos T que más se encuentran relacionadas a la fisiopatología de la AR, teniendo en cuenta que aproximadamente constituyen el 50% o más de células encontradas en el líquido sinovial de pacientes con AR. Aparentemente existe mayor predominio de células Th1 y Th17, y déficit de Th2 y Tregs. Se ha reportado que el desequilibrio entre linfocitos Treg y Th17 favorece a los linfocitos Th17 asociados a inflamación sistémica (Evangelatos, 2019). En la figura 2 se observa que la actividad inflamatoria de los linfocitos T se encuentra relacionada a la activación de macrófagos sinoviales y fibroblastos sinoviales en artritis reumatoide (RASFs). Estos últimos se relacionan con mecanismos epigenéticos responsables de perfiles más agresivos de enfermedad. Estos se caracterizan por ser células con apoptosis reducida y con proliferación aumentada, así como la promoción y producción de citoquinas proinflamatorias. Son responsables del daño tisular por reclutamiento de células inflamatorias. (Gary S Firestein & Monica Guma, 2020)

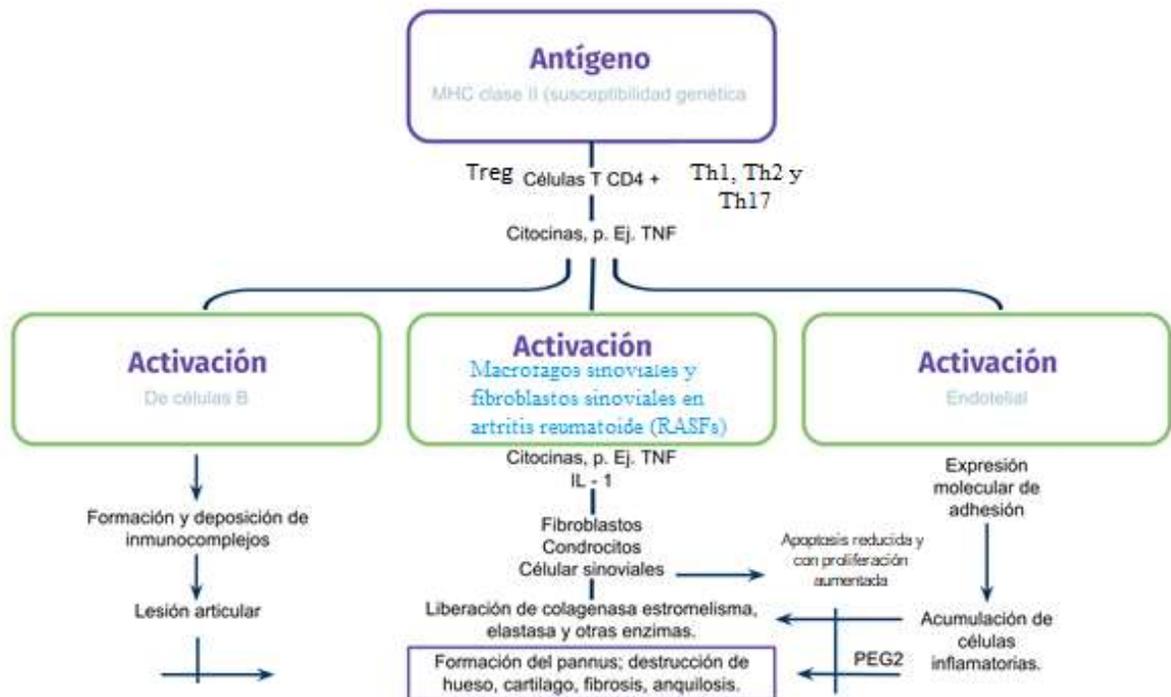


Figura 2: Activación Inflamatoria. Elaboración Propia.

Los linfocitos B se encuentran implicados en altos niveles de autorreactividad, especialmente a las histonas citrulinadas H2A y H2B y otras proteínas relacionadas con neutrófilos citrulinadas llevando a eventos focales. Como se observa en la Figura 3 los linfocitos B, además de ser las células responsables de la presentación antigénica y posterior formación y liberación de anticuerpos, deben considerarse como importantes presentadores antigénicos locales y liberadores de citoquinas proinflamatorias, responsables de la activación endotelial. (Evangelatos, 2019) Entre las citoquinas se encuentra TNF sobre las cuáles actúan los antiTNF como Etanercept, Adalimumab, Infliximab.

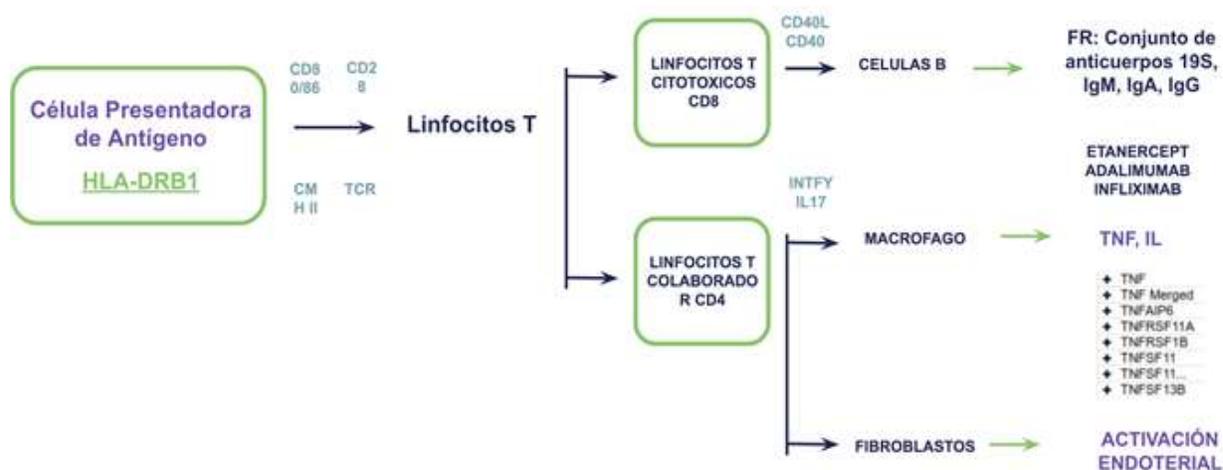


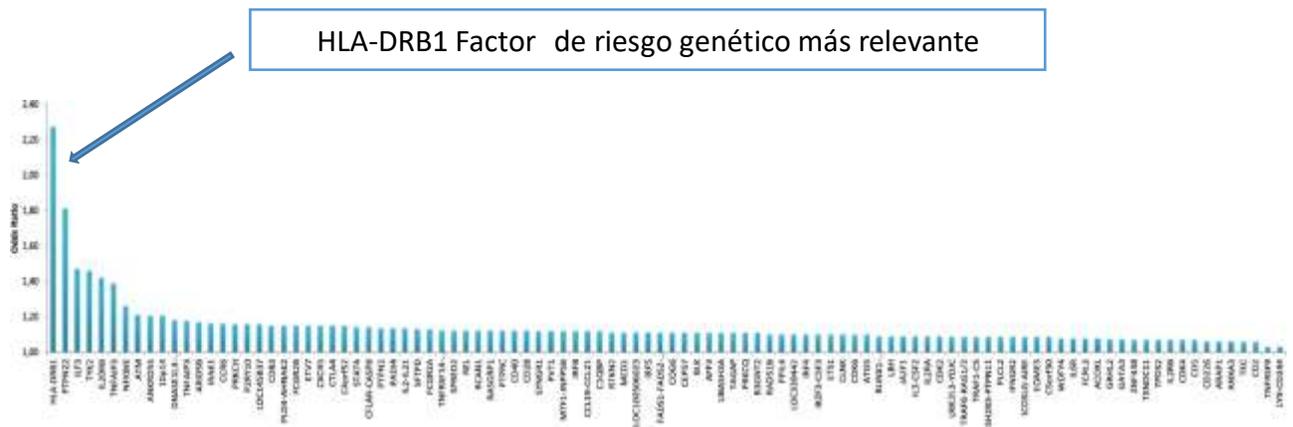
Figura 3: Presentación antigénica y citoquina proinflamatorias. Elaboración Propia.

Como antes fue mencionado, los macrófagos son aquellas células implicadas dentro de la fisiopatología de la AR a la inflamación y erosión condral y ósea a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, degradación enzimática y producción de citoquinas quimiotácticas. (Volkov, 2019) Una de las posibles explicaciones se encuentra relacionada con la vía de señalización de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) y su importancia en la polarización de macrófagos a fenotipos M1 (proinflamatoria) o M2 (antiinflamatorias). Se ha visto que en modelos murinos, la activación de AMPK (*AMP-activated protein kinase*) en los macrófagos está asociado a la supresión de la producción de IL-6, promoción en la

diferenciación de macrófagos con fenotipo M2, y la disminución de procesos inflamatorios en suero. (Firestein GS, 2017) Dentro de la experimentación animal, se ha podido observar que la activación de la vía de señalización mTOR se relaciona con propiedades más invasivas por parte de los FLS (*Fibroblast-like synoviocytes*) en ratones con artritis. Por otra parte, la deficiencia de NRF2, implicada en retroalimentación negativa de AMPK, se relaciona con mayor daño condral y mayores efectos negativos frente a estrés oxidativo en modelos murinos. (Koushik, 2017) Sin embargo, es importante resaltar que la vía de señalización que controla el metabolismo y conversión del fenotipo de los macrófagos no ha sido identificada en modelos humanos (Calabresi E, 2018).

En cuanto a la susceptibilidad genética, múltiples estudios han confirmado la asociación de la AR con algunos alelos del HLA-DR en la mayoría de las etnias, tal como se observa en la Figura 4 en donde según el estudio de Scherer el factor de riesgo genético más relevante se asoció con HLA-DRB1 (Scherer HU, 2020)

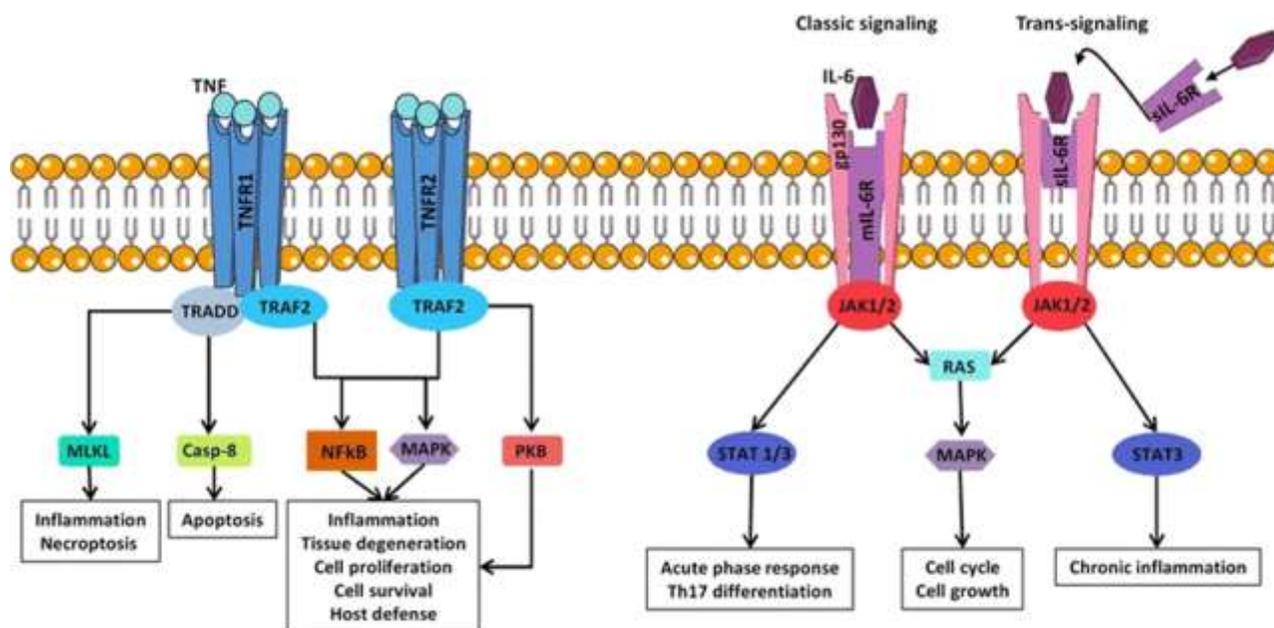
(Calabresi E, 2018)



Tomado de: Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. J Autoimmun. 2020 Jun;110:102400. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102400.

Figura 4 Susceptibilidad genética en AR (Scherer HU, 2020)

Una vez que la inflamación crónica se ha establecido, comienza la respuesta proinflamatoria en la que participan las citocinas y, más en concreto, el TNF- α y la IL-6. El TNF- α es una de las muchas citocinas que se han identificado en la membrana sinovial de los pacientes con AR, produce daño en el cartílago y reabsorción ósea, induce liberación de prostaglandinas y colagenasa por las células sinoviales; desempeña un papel importante en la fibrosis, esto indica que no sólo posee capacidad inflamatoria per se, sino que también es capaz de regular la producción de otros mediadores proinflamatorios, en la Figura 5 se observa la membrana celular y la acción de los receptores de TNF1 y TNF 2 en la respuesta inflamatoria, al igual que la citocina IL6 (Noack M, 2017)



Tomado de Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017 Jun;39(4):365-383. doi: 10.1007/s00281-017-0619-z

Figura 5 Citocina TNF e IL6 en la AR (Noack M, 2017)

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de AR se basa en la combinación de la historia clínica del paciente y el examen físico completo realizado por profesionales en salud. Según la *American College of Rheumatology* (ACR) y la *European League Against Rheumatism* (EULAR) se deben tener unos

criterios precisos de clasificación con el fin de poder determinar de forma eficaz etapas tempranas de la enfermedad (Falconer J, 2018) En Colombia Guía 26 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia (Colciencias., 2016), recomienda el uso clínico para diagnósticos que dichos criterios de clasificación, tal se observan en la siguiente tabla:

Criterios de clasificación de AR del colegio Americano de reumatología (ACR) y la liga Europea contra el reumatismo (EULAR) 2010.	
Población objeto; Los pacientes deben ser evaluados si:	
1	Al menos 1 articulación con sinovitis definida clínicamente (Inflamación).
2	La sinovitis no es explicada por otra enfermedad.*
Criterios de clasificación para AR: Algoritmo de puntuación basado en la suma de las puntuaciones de las categorías A-D.	
Es necesaria una puntuación 6/10 para la clasificación de un paciente con AR definida.&	
Puntaje	
A. Implicaciones articulares.#	
1 articulación grande. +	0
2-10 articulaciones grandes.	1
1-3 articulaciones pequeñas^ (con o sin afección de articulaciones grandes).	2
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin afección de articulaciones grandes).	3
> 10 articulaciones (por lo menos una articulación pequeña).	5
B. Serología ** (Por lo menos es necesario 1 resultado de la prueba para la clasificación).	
FR y Anti-CCP negativos.	0
FR positivo-bajo o Anti-CCP positivo-bajo.	2
FR positivo-alto o Anti-CCP positivo-alto.	3
C. Reactantes de fase aguda (por lo menos es necesario 1 resultado de la prueba para la clasificación).	
PCR y VSG normales.	0
PCR o VSG fuera del valor normal.	1
D. Duración de los síntomas.	
< 6 semanas	0
6 semanas	1

Tabla 1: Criterios ACR/EULAR para diagnóstico de AR (Gómez A, 2011)

Este método de clasificación se compone de cuatro campos, que corresponden a la cantidad de articulaciones comprometidas, resultado de pruebas serológicas, específicamente contra Factor Reumatoide (RF) y ACPA, resultado de reactantes de fase aguda, específicamente Proteína C Reactiva (PCR) y Velocidad de eritrosedimentación (ESR), y por último la duración de los síntomas. Cada uno de estos campos se subdivide y se le otorga una puntuación. Si el puntaje final es igual o mayor a 6, se clasifica al paciente como diagnóstico definitivo de AR. (Jonathan Kay, 2012)

2.6. Presentación Clínica

En general, se considera a la AR como una enfermedad poliarticular, simétrica y bilateral que se caracteriza típicamente por presentar dolor y edema en las articulaciones comprometidas. Las articulaciones que son más afectadas y presentan mayor edematización son las muñecas, articulaciones metacarpofalángicas, metatarsofalángicas e interfalángicas proximales. Otras articulaciones afectadas incluyen tobillos, rodillas, codos y hombros. (Falconer J, 2018) Otro síntoma reportado comúnmente en pacientes con AR es la rigidez matutina que puede durar más de 30 minutos y mejora a lo largo del día. La AR al ser una enfermedad crónica y progresiva, presenta fenotipos estructurales diferentes encontrados en imágenes radiológicas relacionados a las fases de la enfermedad. Estas variaciones fenotípicas son descritas como estrechamiento del espacio articular, erosión ósea, subluxación, anquilosis, y subluxación y cambios mutilantes. Cada hallazgo se relaciona con las etapas de AR las cuales son temprana, moderada, severa y terminal en el orden respectivo. (Falconer J, 2018)

2.7. Tratamiento farmacológico en la artritis reumatoide

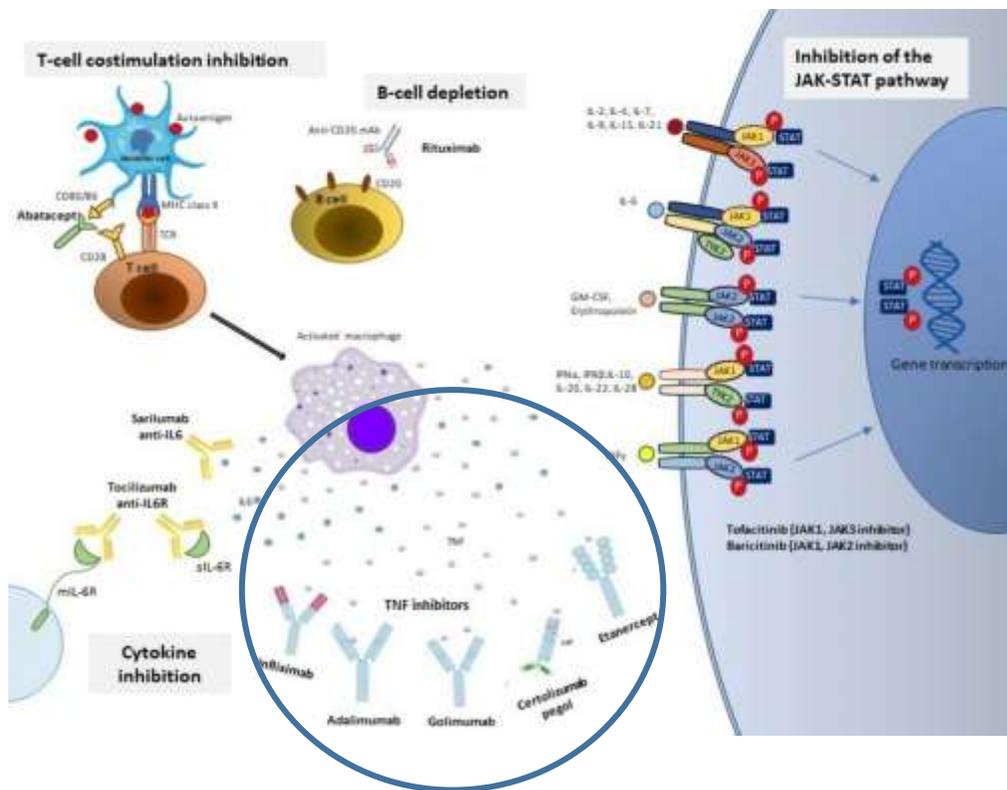
Para el tratamiento de la Artritis Reumatoide de acuerdo con la Guía 26 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia (Colciencias., 2016), los medicamentos utilizados en el Tratamiento de la Artritis Reumatoide se clasifican en:

- Glucocorticoides
- FARME Fármacos Modificadores de la Enfermedad Sintéticos
- FARME Fármacos Modificadores de la Enfermedad Biológicos
- AINES Antiinflamatorios No Esteroideos

Se recomienda el uso de glucocorticoides como coadyuvantes en los pacientes que reciben terapia con fármacos modificadores de la enfermedad, el uso de FARME sintéticos en pacientes con AR temprana, el Metotrexato como FARME en pacientes con AR, la Leflunomida como una alternativa al tratamiento con Metotrexato en pacientes con AR y entre los FARME Biológicos también son recomendados para el tratamiento de la AR el Etanercept y el Rituximab (Colciencias., 2016).

2.8. Mecanismo de acción fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME):

Los FARME se pueden dividir en dos grandes grupos: sintéticos FARMEsc, dirigidos FARMEsd y biológicos FARMEb (originales y biosimilares), tienen la capacidad de cambiar o modificar el curso de la enfermedad, mejorando los niveles séricos de los marcadores de inflamación, como la PCR y la VSG, conservando la función articular y previniendo o disminuyendo el daño articular causado por la enfermedad, logrando de esta manera preservar al máximo la articulación y su funcionamiento, lo que los convierte en el tratamiento de base de la AR y superan el tratamiento sintomático de la inflamación y el dolor, que son el objetivo buscado con el uso de los antiinflamatorios (glucocorticoides y AINEs en general) (Chatzidionysiou & Sfikakis, 2019). Como se observa en la Figura 6 entre los FARMEb se encuentran los anti TNF que inhiben las citocinas.



RMD Open. 2019; 5(2): e000993. doi: 10.1136/rmdopen-2019-000993

Figura 6 FARME aprobados para el tratamiento de la artritis reumatoide (Chatzidionysiou & Sfikakis, 2019)

Entre los FARMESc se encuentran Sintéticos convencionales: Metotrexato, Leflunomida, Sulfasalazina, Cloroquina- Hidroxicloroquina, Azatioprina, Ciclofosfamida, Ciclosporina A, Sales de oro. Entre los Farnesd, se encuentran el Tofacitinib, Baricitinib. Sin embargo, el fármaco de elección en pacientes con AR es el metotrexato en monoterapia o terapia combinada, es por ello que a continuación en la Figura 7 se presenta su mecanismo de acción como medicamento inmunomodulador y antiinflamatorio que interfiere la vía del ácido fólico, inhibiendo competitivamente la dihidrofolato reductasa, impidiendo su activación a ácido folínico o tetrahidrofólico y por ende las reacciones de transmetilación en las que participa la forma activa del ácido fólico. Adicionalmente, estimula la liberación de adenosina, inhibe la acción de polimorfonucleares activados, suprime la síntesis de citocinas (Uribe Liliana, 2010).

Metotrexato:

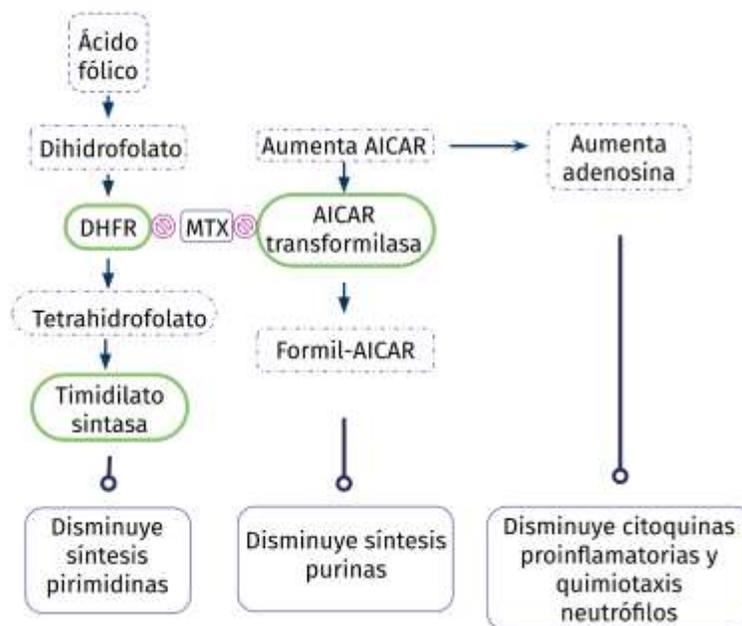


Figura 7 Mecanismo de acción del metotrexato. Elaboración Propia.

2.9. Mecanismo de acción inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (Anti-TNF α)

Los fármacos Anti-TNF α han sido aprobados para el tratamiento de la AR desde el año 2000. En la última década, los Anti-TNF α se han convertido en una importante herramienta terapéutica para el tratamiento de los pacientes con AR establecida, temprana y muy temprana. Los Anti-TNF α Adalimumab (ADA), Etanercept (ETN) e Infliximab (IFX) se encargan de modificar los efectos biológicos del TNF α , que como se ha mencionado, es una citoquina mediadora de la inflamación crónica producida en la AR. Estos medicamentos han mostrado una mejora significativa en el curso de la enfermedad, al modificar la probabilidad de remisión y al reducir o detener la destrucción articular (Solau-Gervais E, 2006).

El adalimumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado tipo inmunoglobulina G1. Es antagonista del TNF- α elaborado mediante ingeniería genética. Ha mostrado una alta especificidad y afinidad por el TNF- α . Presenta una vida media terminal similar a la de la Ig G1 (aproximadamente 2 semanas). Su mecanismo de acción esta dado por el bloqueo de la interacción

entre el TNF α y los sitios de unión (la porción p55 y p75) de los receptores de superficie celular del TNF α .

Se administra en dosis de 40 mg SC cada 2 semanas, sin embargo, cuando el ADA es utilizado en monoterapia, los pacientes que presentan disminución en la respuesta terapéutica, pueden beneficiarse de un aumento de la dosis de adalimumab a 40 mg/cada semana, no obstante, el costo aumenta significativamente (Van de Putte LBA, 2004).

El factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α por sus siglas en inglés hace parte de las citoquinas las cuales actúan como moléculas de señalización local que transmiten información entre las células. Estas citoquinas intervienen y son claves en los procesos de inmunidad, inflamación entre otros procesos biológicos. Debido a esto se ha observado que la ausencia de esta citoquina puede proveer una diferencia clínica; a esta ausencia inducida se le denomina comúnmente como Anti-TNF.

En el mecanismo de Anti-TNF se ve que las proteínas inflamatorias sufren un cambio en las primeras horas, como la IL-6, proteína C reactiva (PCR) y la proteína amiloide A en el suero. Estas dos últimas presentan una disminución en los primeros días, esto denota que la acción de TNF afecta de manera directa la producción de citoquinas, como quimioquinas y la cascada de citoquinas dependiente de TNF. El recuento de monocitos y plaquetas disminuyen, mientras que los linfocitos T que se encuentran bajos en la enfermedad activa de artritis reumatoide, empiezan a subir de manera constante a pocas horas, que deriva en el inicio de una salida de la articulación posiblemente por la falta de moléculas de adhesión. (Udalova I, 2016)

El mecanismo más común e importante descrito para los agentes anti-TNF es la unión y neutralización de la actividad en los receptores TNF. Sin embargo, en recientes investigaciones se ha observado un efecto adicional en relación a la TNF transmembrana (tm TNF) junto con los receptores FC de expresión celular, los cuales tienen asociación con los linfocitos B (Rubbert-Roth A, 2019) Debido a la complejidad que se presenta en la señalización de la citoquina proinflamatoria TNF (Mitoma H, 2018) Un mecanismo fundamental para solucionar la inflamación corresponde a la muerte celular programada o apoptosis, esta acción es perpetrada por los anticuerpos anti-TNF, esta inducción se da de manera directa o indirecta derivada de la señalización de la TNF. Según un estudio realizado en 2015 describió una apoptosis que sería inducida por la región Fc de los anticuerpos anti-TNF que involucra a las células denominadas *Natural killer* (NK) (Levin AD, 2016). En el momento en que se genera el complejo de los

anticuerpos monoclonales con la TNF, persiste inmuno reactiva pero biológicamente inactiva (Meroni PL, 2014), esto explica de cierta manera la razón por la cual en las primeras dosis de Anti-TNF los niveles de TNF séricos aumentan.

La citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) genera que las células diana mediante la unión de los anticuerpos, sean reconocidas por las células de la respuesta inmune celular efectoras como son las NK; en el momento en que se genera esta unión hay un reconocimiento del dominio Fc por los receptores Fc de las células inmunes; este es un mecanismo del sistema inmunológico adaptado para matar las células diana marcadas con anticuerpos, por ejemplo las células infectadas (Yan L, 2015). Por lo tanto, después de la unión de un anticuerpo a su célula objetivo, el dominio Fc es reconocido por el receptor Fc de las células inmunes efectoras, normalmente NK, y liberando así perforinas y granzimas que generan la lisis de la célula diana. En particular en el caso de las células CHO expresantes de mTNF, los anti-TNF habrían inducido el proceso de lisis en un aproximado de 76 % de las células marcadas, esto comparado al valor de referencia usado en el estudio en un isotipo en el cual se generó ADCC en menos del 5% de las células, los primeros receptores que se ven afectados son TNFR1 y TNFR2, responsables del dominio de muerte (DD) y la regulación de la activación en las células T. (Pallai, 2016)

2.10. Efectividad de los fármacos Anti TNF

La efectividad de este tipo de tratamiento de anti TNF en diversas pruebas a mostrado eficacia en una respuesta inicial a los Anti-TNF, sin embargo se ha observado que existe una pérdida de respuesta, que deriva normalmente en cambio del anti-TNF usado o en el aumento en las dosis que se venían usando para el paciente; la presencia o ausencia de ciertos anticuerpos que actúan contra el medicamento (ADA) pueden ser los responsables de esta pérdida en el beneficio clínico del tratamiento. (Yan L, 2015)

Se ha confirmado en múltiples ensayos clínicos, registros de pacientes y meta análisis que una proporción significativa de pacientes tiene que suspender el tratamiento con anti-TNF debido a una respuesta insuficiente, ya que la remisión se alcanza en tan sólo 20 o 30% de los pacientes (F.C. Breedveld, 2006) (St Clair EW, 2004).

Si bien el tratamiento se prefiere por su razonable costo-beneficio hay que tener en cuenta que presenta la problemática de no poder ser usado en todos los pacientes, y sin posible efecto adverso en pacientes que presenten tuberculosis neuropatías, y problemas cardiovasculares (Yan L, 2015)

2.11. Variabilidad en la respuesta a Fármacos Anti TNF

El tratamiento con otras terapias presenta ciertos limitantes; los problemas residuales son uno de estos, como lo son síntomas de dolor residual, fatiga y sensibilidad que persisten en el tiempo. Esto contrasta con su clara disminución en el daño articular y del cartílago, el cual es un poco menor al daño del hueso. (Pallai, 2016) El tratamiento anti-TNF no bloquea totalmente la TNF razón por la cual según investigaciones en Rhône-Alpes, se demostró que, a pesar de la reducción de la actividad inflamatoria y su posible aumento de susceptibilidad a infecciones, el riesgo general de infecciones comparado con pacientes AR tratados con otros medios no cambió. (Reddy, 2016)

Actualmente no hay consenso en cuanto a la definición de la falta de respuesta primaria a un tratamiento anti-TNF. La falta de eficacia primaria se podría reconocer si un paciente nunca responde a un inhibidor de TNF iniciado de manera reciente o falla su respuesta en un plazo de 16 semanas y se ha sugerido que los pacientes podrían ser clasificados como "respondedores" si logran una reducción en el puntaje de actividad de la enfermedad de 28- articulaciones (DAS28) de $\geq 1,2$ desde la línea de base. Una duración más larga de la enfermedad y una actividad mayor antes del comienzo del tratamiento con inhibidores del TNF se han considerado como factores de importancia en la falta de respuesta primaria; sin embargo, las razones del fracaso primario de los antagonistas del TNF aún no están del todo dilucidadas. Adicional se conoce que la AR es una enfermedad heterogénea con variabilidad en los infiltrados inflamatorios en la membrana sinovial, esto hace posible que los mecanismos patógenos principales puedan ser distintos en ciertos subconjuntos de pacientes, que derivan posteriormente a diferentes respuestas clínicas. (Kotyla, 2018).

En varios estudios se ha explorado también una posible asociación de marcadores serológicos o genéticos con la respuesta a los anti-TNF. De esta manera, la presencia del factor reumatoide o de anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados puede asociarse con una respuesta reducida a los

fármacos anti-TNF; sin embargo, estos anticuerpos sólo representan una pequeña proporción de la varianza en las respuestas al tratamiento. Teniendo en cuenta las diversas publicaciones sobre la asociación de los factores genéticos con la respuesta al tratamiento y el resultado en la AR, parece justo decir que, hasta la fecha, no se dispone de parámetros para identificar a los pacientes de los que se podría prever un fracaso primario cuando se les trata con antagonistas del TNF. (Serio, 2018) En un estudio francés se demostró que los pacientes con AR y un genotipo TNF308 G/G tienen una mejor respuesta al infliximab que los que tienen genotipos A/A o A/G; los autores sugirieron que el genotipo TNF308 podría ser un instrumento útil para predecir la respuesta al tratamiento con infliximab. (Kalden, 2017) En el Registro de Artritis de Norfolk (NOAR), el locus HLA-DRB1 se asoció con la respuesta al tratamiento en la AR, así como con la susceptibilidad a la enfermedad, la gravedad radiológica y la mortalidad. Cabe señalar que varios estudios de genotipificación en la AR indican que los predictores genéticos y epigenéticos de la respuesta al tratamiento pueden diferir según el inhibidor del TNF utilizado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchas de las asociaciones genéticas notificadas todavía tienen que ser validadas en diferentes cohortes de pacientes y también que el genotipado no está disponible, al menos por el momento, para su uso rutinario en la práctica clínica. (Bek, 2017) Además, la introducción de estudios de asociación en todo el genoma, así como de estudios de expresión génica para identificar predictores genéticos de la respuesta al tratamiento, podría complicarse aún más por la aparición de diferentes patrones genéticos según el biológico utilizado, incluidos los antagonistas del TNF. (Talotta, 2015) Es interesante que en un informe de 2015 se indicó que los alotipos de inmunoglobulinas humanas de la cadena pesada IgG1 (alotipos G1m1 y G1m17) se asocian con la respuesta al infliximab y podrían mejorar la orientación terapéutica en los pacientes con AR. (Talotta, 2015) .

2.12 Fisiopatología de la Artritis Reumatoide en el tratamiento con Inhibidores del Factor de Necrosis Tumoral alfa, Anti-TNF

Las soluciones terapéuticas para la artritis reumatoide (AR) se consolidan a partir de la introducción de múltiples fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAMEb) biológicos y FAMEs sintéticos; (Fleischmann, 2019); no obstante, se ha demostrado un creciente

uso de agentes biológicos en el tratamiento de la enfermedad, lo cual es atribuible a que estos incluyen un inhibidor de activación de células T / modulador de coestimulación, anticuerpos monoclonales (mAb) inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNFi) y proteína de fusión del receptor, un mAb anti-CD20 y anti interleuquina (IL) -17A, IL- 6, mAb IL-12/23, que tienen estructuras proteicas únicas y diferentes capacidades para inducir respuestas inmunes (Strand, 2017). Los resultados de múltiples ensayos controlados aleatorios (ECA) respaldan la eficacia de los productos biológicos en una variedad de estados de la enfermedad; sin embargo, una proporción significativa de pacientes no presenta respuesta o presenta una respuesta inadecuada con el tratamiento inicial (falla primaria), pierde respuesta con el tiempo (falla secundaria) o desarrolla eventos adversos potencialmente limitantes de la terapia (EA). (Fleischmann, 2019)

Por lo anterior, los esfuerzos investigativos se concentran en buscar e identificar mejores predictores de respuesta a la terapia dirigida individualizada, a través del uso de biomarcadores, incluido el factor reumatoide (RF) y los anticuerpos anti-proteína citrulinada (ACPA), los cuales son altamente específicos para la AR. (Fleischmann, 2019) . En ese sentido, es importante definir que Adalimumab (ADA), es un fármaco antirreumático biológico modificador de la artritis reumatoide (AR); múltiples investigaciones basadas en ensayos clínicos controlados aleatorios (ECA) respaldan su seguridad (Harrold, 2020). Durante una investigación realizada en una cohorte de pacientes en Estados Unidos, se evaluó la seguridad a largo plazo en pacientes con artritis reumatoide (AR) tratados con adalimumab (ADA) en entornos de atención clínica del mundo real, logrando demostrar que la ADA tiene un perfil de seguridad consistente con estudios anteriores, sin que se identificara algún problema de seguridad nuevo con dicho fármaco a largo plazo; por lo tanto, el equipo científico manifiesta que esta confirmación, puede tranquilizar a los proveedores que están iniciando y monitoreando la ADA en sus pacientes. (Harrold, 2020)

Un estudio reciente que partió desde las pautas actuales para el tratamiento de la AR, donde se sugieren el uso de glucocorticoides (GC) en combinación con fármacos antirreumáticos como Adalimumab al inicio del tratamiento para disminuir los signos y síntomas de la AR y reducir la progresión radiográfica, considerando que también se asocia con una variedad de efectos adversos que incluyen osteoporosis, hiperglucemia / diabetes mellitus, eventos cardiovasculares e infecciones; logró determinar que, no se observan diferencias de seguridad clínicamente significativas entre los subgrupos tratados con GC versus los subgrupos no tratados con GC

combinado con adalimumab. (Degboé, 2020) Así mismo, se ha demostrado evidencia clínica de que la inflamación (articulaciones inflamadas) es un buen predictor de una respuesta sostenida futura y respalda el paradigma de la práctica clínica *agresiva de tratar al objetivo*, no obstante, de manera inversa, también sugiere que los individuos con recuento de articulaciones sensibles (TJC) elevados en ausencia de inflamación clínica tienen menos probabilidades de experimentar la resolución de los síntomas. (Hamann, 2019)

Continuando con la relación de los estudios recientes que han puesto a prueba la efectividad y seguridad de las soluciones terapéuticas de mayor uso en la artritis reumatoide, es importante mencionar una investigación que tuvo como objetivo comparar el riesgo de diabetes mellitus (DM) incidente en pacientes con AR tratados con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos o sintéticos dirigidos, dentro de los cuales se incluyó Adalimumab, dicha investigación se basó en un estudio de cohorte observacional, donde se compararon 8 grupos conformado por pacientes diagnosticados con AR que no tenían diabetes, los cuales sufrieron exposición a 8 fármacos diferentes como tratamiento de AR (abatacept, infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab, etanercept, tocilizumab o tofacitinib), la investigación logró concluir que el inicio de abatacept se asoció con un menor riesgo de DM incidente en pacientes con AR en comparación con infliximab o adalimumab. (Desai, 2020)

Adalimumab y sarilumab son inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa y al igual que las citoquinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), actúan como mediadores en el desarrollo de daño óseo y cartilaginosa en las articulaciones sinoviales como resultado de la inflamación crónica ocasionada por la artritis reumatoide (Gabay, 2020), los pacientes con AR tienen un mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares, incluido el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular, en comparación con los individuos sanos, así mismo se ha identificado que adalimumab cuenta con menores efectos positivos sobre la remodelación ósea y disminución de biomarcadores de la respuesta de fase aguda, inflamación sinovial y riesgo cardiovascular, en comparación con sarilumab. (Salomón, 2006) Las concentraciones basales altas de SAA, CRP y MMP-3 son predictivas de las respuestas clínicas y de los resultados informados por el paciente al tratamiento con sarilumab y se justifica la validación prospectiva para confirmar estos resultados. (Gabay, 2020)

La seropositividad para anticuerpos anti-péptidos citrulinados (ACPA) en pacientes con AR, se asocia con peores resultados de la enfermedad a largo plazo, un ensayo de muestras de donantes de sangre de la Cruz Roja de Baviera, Alemania, permitió identificar de manera preliminar que los pacientes seropositivos para las especificidades de ACPA más finas tenían más probabilidades de demostrar una respuesta al tratamiento con metotrexato o adalimumab, lo cual podría deberse a que los pacientes fueron tratados de manera más agresiva debido a la seropositividad conocida de ACPA, por ejemplo, mediante un aumento más rápido de la dosis de metotrexato o un aumento más oportuno a la terapia con una clase de fármaco antirreumático modificador de la enfermedad biológica (bDMARD). (Ling, 2020) La aplicabilidad de la farmacogenómica en una problemática investigativa que involucra temáticas de salud pública a nivel mundial como la relacionada en este documento, sigue vislumbrando como una prospectiva del futuro inmediato, pues sin duda la información genética de un individuo determina los rasgos de predisposición a ciertos procesos metabólicos, induciendo de esta manera la aplicabilidad de la medicina de precisión.

Los estudios relacionados con la farmacogenómica del adalimumab como tratamiento para AR no se encuentran muy bien documentado; sin embargo, si existe evidencia de dicha aplicación en otro tipo de patología. En ese sentido, se hace referencia a una investigación que partió de la hipótesis de que un polimorfismo en FCGR3A (V158F; rs396991) podría estar involucrado en la generación de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y en la resistencia al tratamiento, logrando comprobar que el polimorfismo de V158F tiene alta probabilidad de encontrarse asociado con la producción de ADA contra anticuerpos monoclonales (mAb), esto podría tenerse en cuenta al considerar la dosis y el tipo de anti- factor de necrosis tumoral (TNF) en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (EII). Dichos resultados, sin duda abren una importante discusión científica de gran valor alrededor de las controversias en las relaciones entre el polimorfismo FCGR3A V158F y la respuesta de mAbs, lo cual servirá como referencia en futuros estudios que aborden la participación del polimorfismo V158F en la resistencia y producción de ADA frente al tratamiento anti-TNF, con el fin de adaptar la dosis y el tipo de mAb en pacientes con EII. (Romero, 2018)

Continuando con el hecho de que adalimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante que se une específicamente al TNF- α y neutraliza su función biológica al bloquear su interacción con los receptores de TNF- α de la superficie celular, funcionalidad por la cual ha sido utilizado en el tratamiento de la AR durante años; no obstante, aunque el adalimumab es un

anticuerpo monoclonal completamente humanizado que como otras terapias basadas en proteínas, presenta inmunogenicidad en algunos pacientes, los cuales desarrollan anticuerpos anti-adalimumab (AAA), llevando a demostrar una respuesta terapéutica reducida (Liu, 2018).

Las apuestas investigativas en AR se centran cada vez más en el descubrimiento de biomarcadores que podrían permitir tratamientos personalizados, lo anterior ha sido impulsado por la cifra importante de pacientes que no presentan una respuesta adecuada a fármacos específicos, aunque sí pueden responder a otros. Alrededor del 30% de los pacientes tratados con terapias farmacológicas específicas desarrollan anticuerpos antifármaco, respondiendo inadecuadamente a este; es precisamente en estas situaciones en que la farmacogenómica juega un papel relevante, pues para predecir la respuesta a tratamientos farmacológicos específicos que permitan potencializar sus beneficios, disminuir efectos secundarios innecesarios y minimizar costos la identificación de biomarcadores es indispensable. (Cuppen, 2015).

Una investigación reciente realizó la evaluación de 12 polimorfismos de nucleótido único (SNP) extraídos de un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) como biomarcadores de la respuesta de la artritis reumatoide a los inhibidores del Factor de necrosis tumoral (TNF), como una posible asociación de SNP con la respuesta a etanercept, esta investigación se realizó en 755 pacientes con AR que fueron tratados por primera vez con un fármaco biológico, que fue infliximab, etanercept o adalimumab. Sus muestras de ADN fueron genotipadas con éxito con un método multiplex de extensión de base única, sin embargo, no se observó asociación entre los 12 SNP con la respuesta a la inhibición de TNF, los resultados mencionados destacan la complejidad de la farmacogenética de inhibición de TNF en la AR, mostrando que podría involucrar un componente específico de un fármaco y aclarando el estado de los 12 SNP extraídos de GWAS. (Moreno, 2019)

Es evidente que en los últimos años se ha avanzado significativamente en la identificación de variantes genéticas de importancia clínica, por lo que actualmente se puede contar con una base genética de la artritis reumatoide humana; sin embargo, los científicos coinciden en manifestar que una mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad sería sin duda la alternativa que más promete como herramienta de diagnóstico y pronóstico basado en esta información, (Goulielmos, 2016) es decir, la aplicabilidad de la farmacogenómica en la identificación de un tratamiento efectivo y seguro para los pacientes diagnosticados. Si bien, esta aplicación no está refinada al punto de su utilidad clínica en la AR, los investigadores, manifiestan que es muy probable que se

empleen conjuntos de datos de múltiples parámetros, incluidos datos genéticos, clínicos y de biomarcadores, en la atención futura de los pacientes que padecen dicha patología, en ese sentido, se espera que los avances en genómica, incluidas las tecnologías secuenciación de nueva generación de (NGS), permitan un enfoque más personalizado de la atención clínica, con una mejor estratificación del riesgo y selección de tratamientos. (Goulielmos, 2016)

Por lo tanto, medir la frecuencia de células B (centro del sistema inmunitario adaptativo humoral responsable de producir inmunoglobulinas (Ig) específicas de antígenos conocidas como anticuerpos dirigidas frente a invasores patógenos) (Roghalian, s.f.), de memoria que expresan proteína reguladora de señales (SIRP α / β) en pacientes antes del tratamiento con adalimumab, puede ser clínicamente útil para identificar un subgrupo pacientes con artritis reumatoide activa que van a desarrollar una respuesta anti-fármaco (ADA) y no obtendrán un beneficio clínico sustancial de este tratamiento. (Magill, 2018) De esta manera se evita la exposición personalizada a un fármaco que será inefectivo y que en consecuencia podría acarrear efectos secundarios como los mencionados a lo largo de este documento, sin ser menos importantes, la disminución de los costos en los sistemas de salud mundial generados a partir de tratamientos farmacológicos no personalizados.

Por otro lado, la mejora de sintomatología asociada como la inflamación, se asocia con una mejora en la función de las HDL y cambios en varias proteínas asociadas a las HDL. (Schoeman, 2018) Sin duda, la identificación de biomarcadores de respuesta han sido el objeto de la aplicabilidad en la farmacogenómica, durante los últimos años estas investigaciones han estado basadas en hipótesis como que las proteínas séricas son candidatas a la respuesta de adalimumab y al infliximab en la artritis reumatoide; durante este estudio específico se logró el descubrimiento de nuevos biomarcadores putativos de respuesta a anticuerpos anti drogas (ADA). Estos resultados sugieren que los biomarcadores de proteínas séricas podrán informar la elección entre los Inhibidores de Factor de Necrosis Tumoral (TNFi) respondedores y no respondedores y, probablemente, también en relación con otros biológicos conocidos conjuntamente como bDMARD. (Ortea, 2016); del mismo modo, durante un análisis transcriptómico y genómico combinado, se buscó identificar una variable genética asociada con la respuesta a la terapia anti-TNF en la artritis reumatoide; este proceso se desarrolló a partir del análisis secuencial multiómico,

integrando diferentes fuentes de información molecular, permitiendo concluir que la existencia de una base genética específica de fármacos para la respuesta anti-TNF respalda la estratificación del tratamiento en la búsqueda de biomarcadores de respuesta en la AR. (Ortea, 2016)

Dicho todo lo anterior, es indispensable concluir que el tratamiento para artritis reumatoide muestra una variabilidad interindividual que imposibilita la generalidad terapéutica; en ese sentido, la farmacogenómica se presenta como la alternativa más eficiente y segura para combatir la sintomatología crónica de una patología que sufre gran porcentaje de la población mundial y de los cuales un tercio de los pacientes no muestran una respuesta clínica significativa a los tratamientos tradicionales. Los principios en los que basa esta disciplina abren una esperanza en la comunidad científica y pacientes, puesto que están basados en el uso de la información genética personalizada que posee cada individuo, utilizándose como un método de predicción de no respuesta y/o respuesta negativa a una terapia farmacológica específica, incluyendo los tratamientos de base biológica más usados como Adalimumab. (Aterido, 2019)

2.13. Biomarcadores en artritis reumatoide

2.13.1 Definición biomarcadores

Un biomarcador es una característica o un cambio fisiológico, bioquímico o morfológico medible y evaluable a nivel molecular, bioquímico o celular que actúa como indicador de un proceso biológico normal o patológico, o como respuesta a una intervención terapéutica. (Fidel Ortega-Ortiz Apodaca (Ed.), 2010) Los biomarcadores se clasifican según la información que proporcionan y según su naturaleza. Estos biomarcadores son importantes para la identificación de individuos en una población que pueden ser sensibles a un determinado problema de salud. Este tipo de biomarcadores se clasifican en biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad. (Puentes Osorio Yolima, 2018)

Los biomarcadores de exposición evalúan en un organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del medio que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana.

También se denominan biomarcadores de diagnóstico, ya que dan información sobre si un paciente padece alguna enfermedad o ha estado expuesto a algún tóxico o patógeno. Por ejemplo, el anticuerpo anti-transglutaminasa tisular es un biomarcador de diagnóstico de la enfermedad celíaca. (Nuez, 2000)

Los biomarcadores pronósticos informan sobre la progresión de la enfermedad, es decir, si la enfermedad mejora o empeora tras el tratamiento correspondiente. El receptor de membrana EphB4 es un biomarcador de pronóstico del cáncer de colon. (Fidel Ortega-Ortiz Apodaca (Ed.), 2010)

Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica. También se denominan biomarcadores terapéuticos ya que permiten la identificación y seguimiento de la respuesta al tratamiento de una enfermedad. (Arora A. M., 2013)

Los biomarcadores según su naturaleza se clasifican en: ómicos que proceden del estudio de genes (genómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica); Epigenética que proviene de cambios que ocurren como respuesta medioambiental y modifican postraduccionalmente la síntesis de proteínas, están relacionados con alguna patología, y moléculas de microARN que se expresan en diferentes cantidades en células normales o cancerosas (genómica / transcriptómica). (Arora A. M., 2013)

2.13.2. Biomarcador Ideal

El biomarcador ideal debe proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéutica, adicional a la que se puede obtener de los datos clínicos del paciente, y debe poseer características químico-analíticas (Lock EA, 2008) como:

- **ALTA ESPECIFICIDAD:** la medición de ese biomarcador debe ser específica de una enfermedad.

- **MUESTRA:** la recogida de muestras debe ser mínimamente invasiva. Por ejemplo, la saliva es mejor que la orina y es mejor que la sangre.
- **REPRESENTATIVIDAD:** los niveles de biomarcadores en la muestra de selección de niveles representativos del biomarcador en el organismo.
- **ESTABILIDAD:** Se debe conocer la cinética

En cuanto a la seguridad farmacológica del paciente, el biomarcador ideal debe estar dirigido a los procesadores sanitarios. Es aconsejable orientar el seguimiento y los programas farmacoterapéuticos para el uso adecuado de la medicación; a través de esos elementos señaladores (trazadores o marcadores)

En este sentido, la detección de estos eventos es muy recomendable, a través de sistemas de información que permitan la detección de indicadores (señales o marcadores) de este aspecto (monitoreo sistematizado de señales de alerta), tales como: identificación de algunos medicamentos, pruebas de laboratorio, síntomas o diagnósticos, y notas o frases médicas en historias clínicas. (Castro-Santos P, 2015)

2.13.3 Utilidad Clínica de los Biomarcadores en la Artritis Reumatoide

El proceso de atención de la salud necesita parámetros para evaluar la eficacia y seguridad de la farmacoterapia. En este contexto, los biomarcadores son una excelente herramienta de información para la prevención, el diagnóstico, la progresión de la enfermedad, la selección del tratamiento y la evaluación de la respuesta a la terapia farmacodinámica, así como su aplicación en la evaluación experimental. (Poste G, 2011)

Por tanto, resulta útil para mejorar el conocimiento de diferentes enfermedades en diversos aspectos como: tratamiento, prevención, diagnóstico y progresión de la enfermedad, respuestas a la terapia, evaluación toxicológica experimental de fármacos o plaguicidas, medición de riesgos ambientales y epidemiológicos, además de evaluación de intervención terapéutica, entre otros

(Vainio H, 2001). El rápido crecimiento de la tecnología, la validación y elucidación de procesos y procedimientos en biología molecular, química analítica y bioinformática han aumentado la aplicación de biomarcadores moleculares en la investigación; destacando los biomarcadores ómicos: transcriptómica, genómica, proteómica y metabolómica (Wilkinson G, 2005).

La utilidad del uso de biomarcadores para la salud contribuye a la selección de medicamentos, evaluación de la progresión de enfermedades y su tratamiento; de la misma forma, el desarrollo tecnológico hace posible que los biomarcadores implementados se ajusten cada vez más al concepto de biomarcador ideal, es decir, que sean cada vez más específicos y fundamentales en el desarrollo de las distintas disciplinas biomédicas, que permiten la elaboración de estrategias y políticas para mejorar las condiciones de vida de los pacientes con artritis reumatoide.

De esta forma, brindamos una visión general de la farmacogenómica de la AR y la posibilidad de utilizar, en la práctica clínica, biomarcadores ómicos para apoyar la decisión farmacoterapéutica, con el fin de mejorar la respuesta al tratamiento de esta enfermedad tal como se muestra en la Figura 8,



Figura 8: Estadío de AR, fases y biomarcadores: Elaboración Propia.

La relevancia de este estudio es brindar la posibilidad de aplicar la investigación de biomarcadores ómicos, seleccionados por su importancia biológica, ya sea en la cinética o su relación en la acción farmacológica, en la identificación de individuos en riesgo de experimentar efectos adversos o con probabilidad de ser resistente al tratamiento. Por tanto, se espera que la información generada pueda ser utilizada en la práctica clínica diaria, ayudando a identificar la mejor opción terapéutica (mayor efectividad y seguridad) en pacientes con AR.

Globalmente, los individuos responden de manera diferente a la terapia con medicamentos y ningún medicamento es 100% efectivo en todos los pacientes (Wijnen P., 2007), lo que puede ocurrir debido a una alteración en la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos, asociada a condiciones genético-ambientales (Johnson J., 2013). En este contexto, el estudio de

biomarcadores ómicos ha tenido más éxito en la identificación y explicación de la variación de la respuesta farmacológica, en comparación con las investigaciones de genes candidatos de la enfermedad (Puentes-Osorio Y, 2021). Por tanto, este trabajo debe contribuir a la elección de la mejor opción terapéutica en pacientes con artritis reumatoide, según la fase de la enfermedad, y esta es una base para continuar la investigación encaminada a la identificación de biomarcadores ómicos según el estadio de la AR. y la fase de tratamiento. (South ST, 2013)

En la última década se ha realizado un gran esfuerzo por encontrar biomarcadores ómicos capaces de predecir la respuesta a la terapia en un paciente con artritis reumatoide. Se han explorado muchos biomarcadores y, a pesar de que se han identificado varios biomarcadores ómicos, existen limitaciones con respecto a su especificidad, facilidad de muestreo, representatividad y estabilidad para predecir la respuesta. Por lo tanto, aún se necesita una investigación más exhaustiva en la identificación de biomarcadores ómicos en las diferentes fases de la artritis reumatoide, con técnicas prometedoras de secuenciación de próxima generación y resonancia magnética nuclear.

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño de estudio

3.1.1. Tipo de estudio casos y controles

El estudio de casos y controles tiene como objetivo determinar si la frecuencia de aparición de una variable en estudio es diferente en los “casos (variante genómica)” respecto de los “controles (ausencia de variante genómica)” (Vainio H, 2001). Para el caso de estudios de farmacogenómica, como el presente estudio, el diseño de casos y controles es retrospectivo frente al fallo terapéutico; sin embargo, la recolección de los datos genómicos (Variable de Estudio) es prospectiva, para determinar las posibles variantes genómicas que podrían estar asociadas con el fallo terapéutico de adalimumab (Desenlace). En este sentido, en el estudio se compara un grupo de casos formado por: 1) Pacientes con AR, en tratamiento por mínimo 3 meses con Anti TNF- α , en monoterapia o terapia combinada, que presentan fallo terapéutico a adalimumab y 2) Pacientes con AR, en tratamiento con Anti TNF- α , en monoterapia o terapia combinada que NO presentan fallo terapéutico a adalimumab..

Representatividad: Los casos representan el universo de pacientes con AR en tratamiento con Adalimumab que presentan fallo terapéutico. Los controles no presentan fallo terapéutico pero podrían convertirse en casos. Tanto los casos como los controles proceden de población colombiana con AR. Simultaneidad: Para asegurar la comparabilidad de las exposiciones, casos y controles se seleccionaron en un período similar desde Julio de 2018 hasta Agosto de 2019. Comparabilidad: Casos y controles proceden de las mismas instituciones de salud

Desde una perspectiva general el estudio se realiza con pacientes por lo cuál es clínico de tipo analítico.

Fue registrado en ClinicalTrials.gov con los siguientes datos:

ID: NCT 03352622

Registrado en junio de 2017.

El presente estudio se ha llevado a cabo en el Hospital Pablo Tobón Uribe, Reumalab y Artmédica, entidades prestadoras de servicio de salud en Colombia y en la Unidad de Investigación Genética Molecular UNIGEM.

La captación de la población a estudio se realizó durante un periodo de 14 meses (julio de 2018-agosto 2019).

El proyecto recibió la aprobación del Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe (Anexo 1) y se le otorgó una ayuda oficial para su realización mediante la convocatoria 727 de MinCiencias Colombia y se realizó la pasantía internacional en el Hospital Universitario Virgen de la Macarena en Sevilla, España (Anexo 2).

3.2 Población de estudio

El tamaño de la muestra para el estudio de casos y controles se calculó mediante el programa Epi-info, con el método cuadrático de Fleiss, un nivel de confianza del 95%, un poder estadístico del 80%, una incidencia del 70% y una proporción caso-control de 1 a 1. Con estos datos la muestra estimada fue 10 casos y 10 controles y para probar la hipótesis de la asociación de SNP con el fallo terapéutico de adalimumab, se estimó una Odds Ratio mínimo de 21; la cual permite descubrir los SNP más significativos dado su valor.

Incidencia de Fallo Terapéutico AR 70%-80%, es decir remisiones entre el 20-30%, se escoge la mayor remisión y el menor fallo terapéutico 70% porque en la época se estaban realizando muchos esfuerzos por mejorar la remisión de los pacientes de manera tal que el fallo terapéutico tendía a disminuir, esto le da mayor fuerza al estudio. (Deane, 2020) (Balsa, 2011) (F.C. Breedveld, 2006) (Klareskog L, 2004) (St Clair EW, 2004)

3.3 Criterios de inclusión y exclusión

Fueron elegibles para entrar en el estudio todos aquellos pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión que a continuación se especifican.

3.3.1 Criterios de inclusión:

Se admitieron en el estudio:

- Pacientes con AR tratados con Adalimumab en monoterapia o terapia combinada con Metotrexato.
- Mayores de 18 años.
- Pacientes en remisión (Controles).
- Pacientes que no alcanzaron la remisión (Casos).
- Uso de medicamento por mínimo 3 meses.
- Uso de anti TNF α por primera vez.
- Pacientes que aceptaron participar y firmar el consentimiento informado.

3.3.2 Criterios de exclusión

No se aceptaron:

- Pacientes que luego de aplicar la herramienta para identificar otras causas de variabilidad; se identificó que la variabilidad en la respuesta se da por otras causas como no adherencia, por viajes, olvido, etc.
- Pacientes tratados con Anti TNF diferentes a Adalimumab
- Pacientes Hospitalizados.
- Uso previo de medicamentos anti TNF- α .
- Pacientes sin secuenciación genómica

3.4 Variables de estudio

- Variables principales:

Variantes genómicas: polimorfismos de un solo nucleótido presentes o ausentes en casos o controles

- Variables relacionadas con factores individuales de la paciente:
 - Género.
 - Medicamentos concomitantes.
 - Edad (años).
 - Estatura (cm).
 - Peso.
 - IMC.
 - Antecedentes familiares.
 - Actividad física.
 - Escolaridad.
 - Ocupación.
 - Acceso a Medicamentos.

3.5 Reclutamiento y recolección de datos

Para el estudio fueron seleccionados pacientes con AR tratados con el anti TNF Adalimumab en monoterapia o terapia combinada, quienes aceptaron participar y firmar el consentimiento informado Anexo 3.

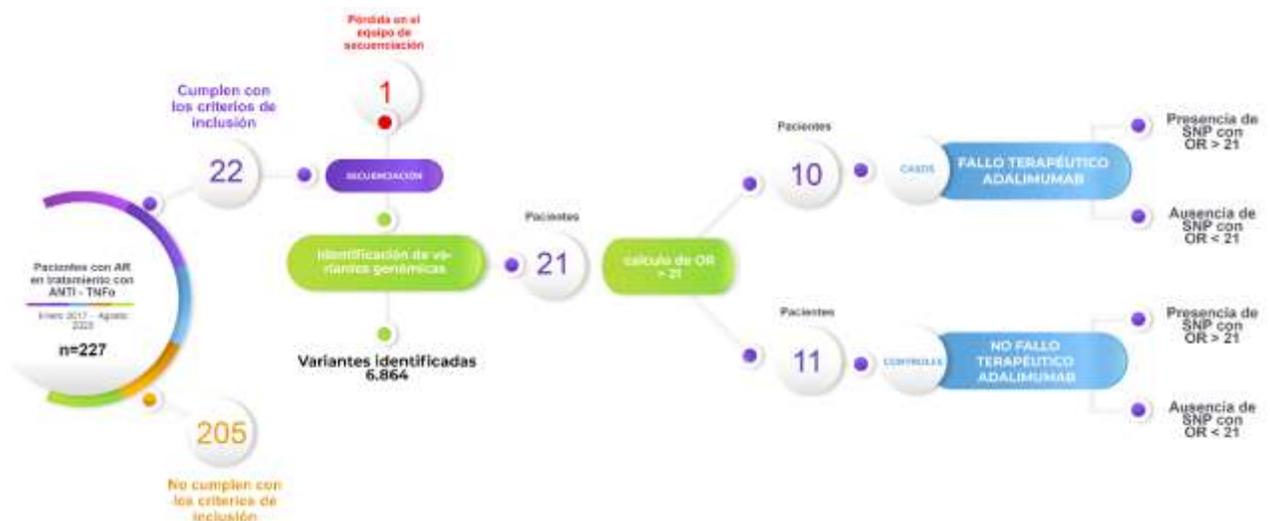


Figura 9: Reclutamiento Casos y Controles. Elaboración Propia

Como se muestra en la figura 9, se recolectó información de 227 pacientes, pues la primera versión del protocolo de investigación presentada buscaba analizar diferentes AntiTNF, no solo Adalimumab, lo cual requería mayor tamaño muestral y hacía inviable la investigación dado que la secuenciación genómica para descubrimiento era bastante costosa. Con la actualización del protocolo al comité de ética se busca el medicamentos Anti TNF con mayor uso en la práctica clínica, en la época en Colombia y se seleccionaron pacientes tratados con adalimumab divididos en dos grupos de pacientes casos y controles.

Las entidades prestadoras de servicio de salud que atienden pacientes con artritis reumatoide brindaron su apoyo para la vinculación de pacientes a la investigación, Artmedica que una institución prestadora de servicios en salud en Colombia, que tiene como propósito fundamental, diseñar y poner en marcha modelos de gestión de riesgo en enfermedades de alto impacto determinadas por las siguientes características: Graves desenlaces fisio-patogénicos, alta prevalencia y con grandes repercusiones al sistema de salud en Colombia , Reumalab especializada en medicina en el área y el Hospital Pablo Tobón Uribe que es un hospital universitario de alta complejidad, atiende a una amplia población de Colombia.

El grupo 1 (casos) estuvo conformado por: Pacientes con AR tratados Adalimumab, en monoterapia o terapia combinada, mayores de 18 años, con uso de anti TNF por mínimo 3 meses y reporte de **no** remisión.

El grupo 2 (controles) estuvo conformado por pacientes AR tratados con Adalimumab, monoterapia o terapia combinada, mayores de 18 años, con uso de anti TNF por mínimo 3 meses y reporte de remisión.

La recolección de la información se realizó en las entidades prestadoras de servicios de salud, para ello se realizaron diferentes reuniones de capacitación a los médicos reumatólogos, quienes posteriormente identificaban en el Anexo 4 a los posibles pacientes para la investigación tratados con un Anti TNF- α , le explicaban los detalles y si el paciente aceptaba diligenciar el consentimiento informado, pasaba a enfermería para toma de muestra, envío de muestra de sangre al laboratorio Unigem y se procedía a realizar la respectiva entrevista por el Químico Farmacéutico para aplicar herramienta de otras causas de Variabilidad Anexo 5 Test Morisky Green Levine de 4 preguntas

y revisión cumplimiento de criterios de inclusión, para ello se contó también como material de apoyo Anexos 6 y 7 con información de la investigación y cuestionario de apoyo para la evaluación de adherencia. La recolección de datos se inició de forma prospectiva, una vez se obtuvo la aprobación del comité de ética del Hospital Pablo Tobón Uribe.

El procedimiento para la obtención de los grupos de estudio fue actualizado en el protocolo de investigación V2 y remitido de nuevo al comité de ética del Hospital Pablo Tobón Uribe para la inclusión en el estudio únicamente de pacientes tratados con Adalimumab y con disponibilidad de ADN y reactivos suficientes para la secuenciación de próxima generación.

Grupo 1 Casos

- Pacientes con AR tratados con Adalimumab en monoterapia o terapia combinada con Metotrexato.
- Mayores de 18 años.
- Con DAS 28 mayor de 3,2 y/o SDAI mayor de 3,3 (Casos).
- Uso de medicamento por mínimo 3 meses.
- Uso de anti TNF α por primera vez.
- Pacientes que aceptaron participar y firmar el consentimiento informado.
- Pacientes con obtención de muestra de sangre para extracción de Adn satisfactoria.
- Pacientes con extracción exitosa de Adn por parte del laboratorio Unigem.
- Pacientes con disponibilidad de Kit de reactivos para la secuenciación de próxima generación.

Grupo 2: Controles emparejados por edad y sexo que cumplieran adicionalmente los siguientes requisitos:

- Pacientes con AR tratados con Adalimumab en monoterapia o terapia combinada con Metotrexato.
- Mayores de 18 años.
- Con DAS28 menor o igual a 3,2 y/o SDAI menor o igual a 3,3.
- Uso de medicamento por mínimo 3 meses.
- Uso de anti TNF α por primera vez.

- Pacientes que aceptaron participar y firmar el consentimiento informado.
- Pacientes con obtención de muestra de sangre para extracción de Adn satisfactoria.
- Pacientes con extracción exitosa de Adn por parte del laboratorio Unigem.
- Pacientes con disponibilidad de Kit de reactivos para la secuenciación de próxima generación.

Uno de los pacientes tuvo concentración de DNA menor de 50ug/ml, por lo cual no es una muestra apta para secuenciar. Se tomaron como fuentes de información, los registros de la historia clínica de las entidades de salud, en el cual se registra la información relacionada con la farmacoterapia del paciente, los efectos adversos y la remisión de los pacientes.

3.6 Análisis estadístico

Las características basales y demográficas se analizaron descriptivamente (media, desviación estándar, mediana, rango intercuartílico y proporciones para variables cualitativas). Las comparaciones para variables categóricas se realizaron utilizando la prueba de chi-cuadrado (o la prueba exacta de Fisher cuando era apropiado) y para variables continuas la prueba U de Mann-Whitney. La prueba t de Student (entre grupos de estudio) se utilizó para comparar medias, y también se estimaron los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95%. Se realizaron análisis univariados y bivariados. Las variables sociodemográficas a evaluar fueron: Género, medicamentos concomitantes, edad, estatura, peso, IMC, antecedentes familiares, actividad física, escolaridad, ocupación, acceso a medicamentos

En el diseño de estudio desde los criterios de selección se controlaron confusores en especial la adherencia y acceso al tratamiento por parte de los pacientes.

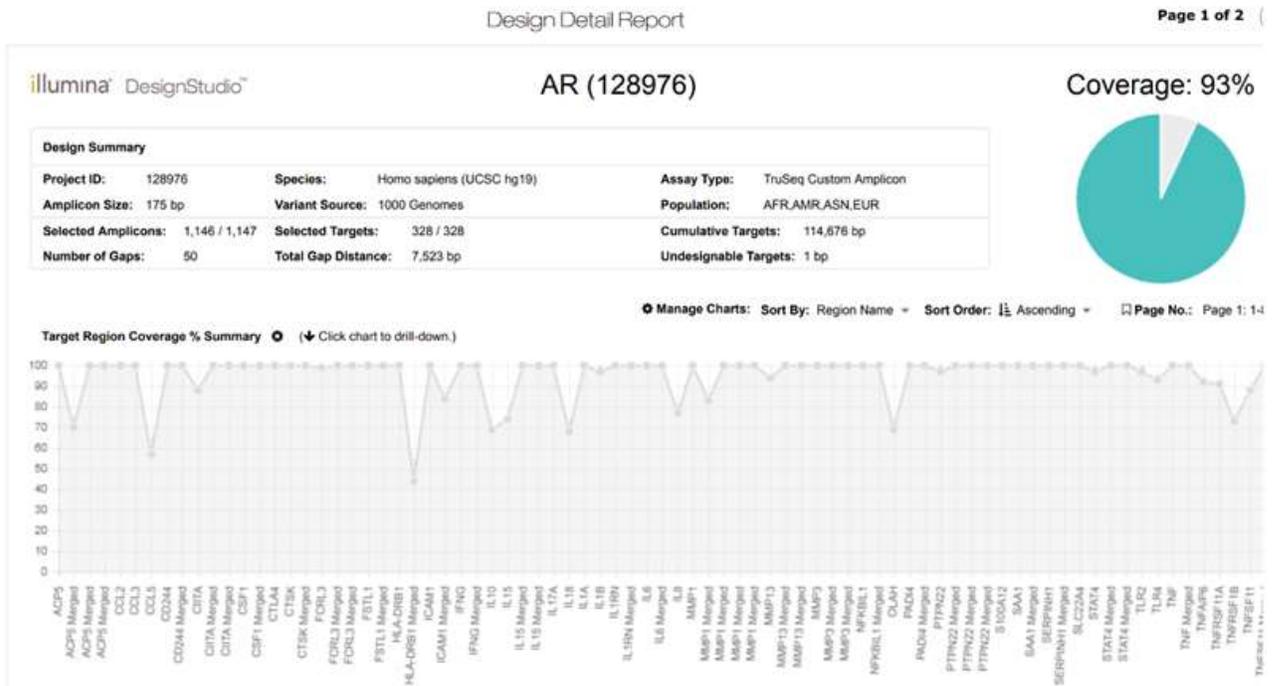
3.7 Limitaciones y sesgo potencial

Si bien en los estudios de casos y controles, existe mayor riesgo de sesgos selección y memoria, el presente estudio minimiza estos riesgos de sesgos al tomar datos genómicos de manera prospectiva y con el emparejamiento que se hizo entre los grupos de casos y controles.

3.8 Técnicas de procesamiento

Secuenciación de próxima Generación

Para realizar la secuenciación de próxima secuenciación lo primero que se realiza es diseñar el panel de secuenciación específico, para ello se realizan revisiones sistemáticas para elegir los genes a estudiar en el caso de la presente investigación. A continuación, en las figuras 10 y 11 se presenta un panel de secuenciación diseñado para el estudio junto con los amplicones.



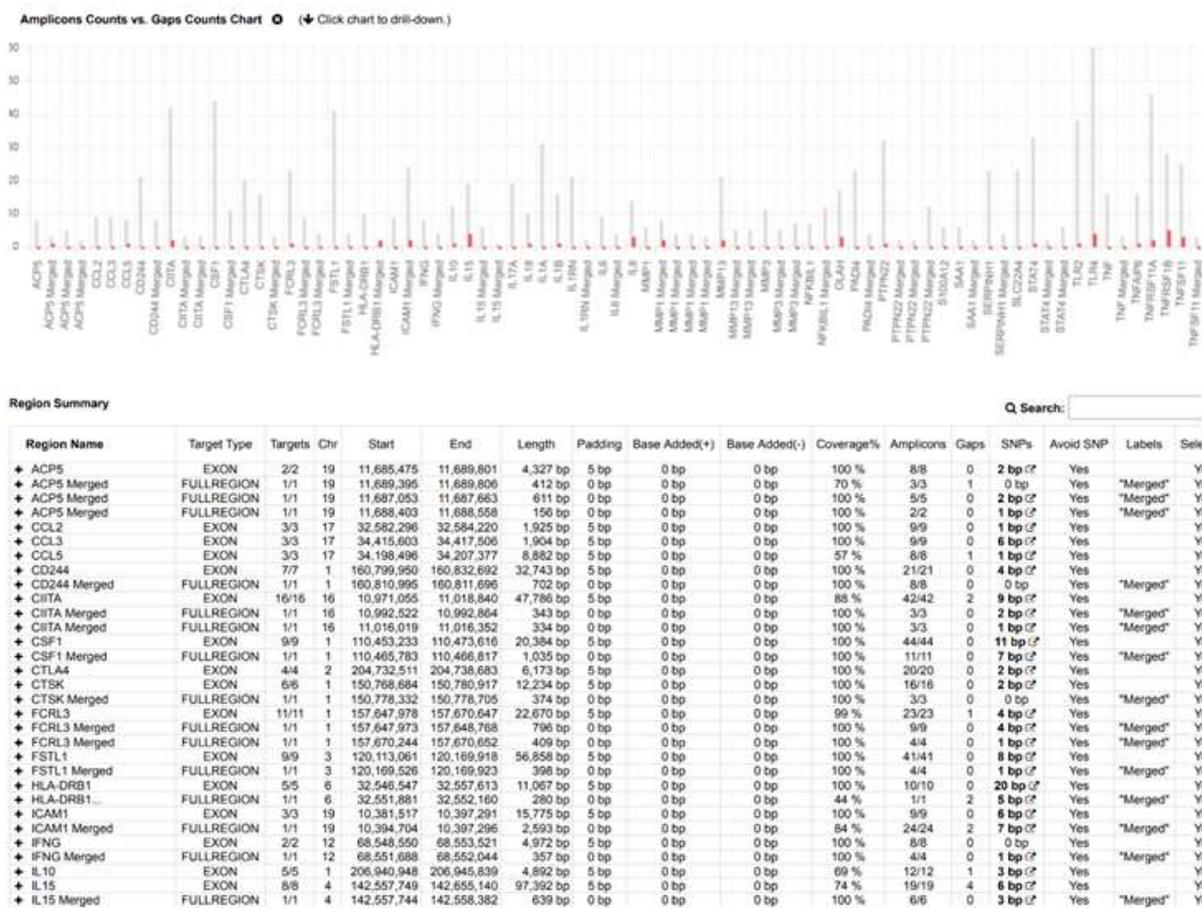


Figura 11: Amplicones Panel de Secuenciación. Extraído Software Desig Illumina

La técnica de secuenciación, fue TruSeq Custom Amplicón y de utilizó el kit de Truesight one de illumina, la extracción del DNA del paciente fue por sangre periférica, la cual se obtenía una vez el paciente acepta firmar el consentimiento informado y se trasladaba a Unigem en donde se hizo la preparación de liberías y se inició la secuenciación

A continuación, en la Tabla 2 se mencionan las especificaciones de cada parámetro que es reportado en el informe de diseño del ensayo del panel de secuenciación:

Project ID: 128976	Corresponde al código de identificación asignado al ensayo realizado.
Species: Homo sapiens (UCSC hg19)	Indica la especie para la cual el ensayo está diseñado. Corresponde al genoma humano (Homo sapiens) el cual está almacenado en 23 pares de cromosomas. Veintidós de estos son pares de cromosomas autosómicos y el par restante determina el sexo. El Proyecto del Genoma Humano (HGP) produjo una secuencia de referencia del genoma humano la cual es utilizada en todo el mundo en las ciencias biomédicas, en este caso para extraer la información de los genes evaluados en el panel seleccionado.
Assay Type: TruSeq Custom Amplicon	Corresponde al tipo de ensayo que será usado.
Amplicon Size: 175 bp	Hace referencia al tamaño promedio de los amplicones que serán generados en el proceso de elongación, y que serán evaluados mediante secuenciación.
Variant Source: 1000 Genomes	Indica el patrón o la referencia de las secuencias de ADN utilizadas para el diseño del ensayo (Resultados del proyecto 1000 genomas). El objetivo del Proyecto 1000 Genomas fue encontrar la mayoría de las variantes genéticas con frecuencias de al menos 1% en las poblaciones estudiadas.
Population: AFR, AMR, AS, EUR	AFR (Africana), AMR (Americana), AS (Asiático del este), EUR (Europeo). Hace referencia a las poblaciones utilizadas para la secuencia de referencia, más específicamente a los grupos étnicos. Un grupo étnico hace referencia a las comunidades formadas por conjuntos de personas que provienen de una misma población y comparten características genéticas.
Selected Amplicons: 1,146/1,147	En total en el ensayo, se evaluarán entre 1,146 y 1,147 fragmentos de ADN correspondientes a los amplicones de los 42-43 genes evaluados.
Selected Targets: 328/328	Del conjunto de amplicones a evaluar (1,146), se analizaran un total 328 regiones genéticas.

Cumulative Targets: 114,676 bp	En total las 328 regiones de interés tienen un tamaño aproximado de 114,676 pares de bases nucleotídicas.
Number of Gaps: 50	Dentro la totalidad de las regiones genéticas a evaluar, se espera un total de 50 espacios o GAPS.
Total Gap Distance: 7,523 bp	Los 50 GAPS corresponden a un total de 7,523 pares de bases nucleotídicas que no pueden no ser elongadas. Es decir, la longitud total en pares de bases de todos los espacios en el ensayo.
Undesignable Targets: 1 bp	Indica que 1 par de bases nucleotídicas no fueron identificadas.

Tabla 2: Especificaciones parámetros panel de secuenciación diseñado.

Seguido en el reporte del diseño de ensayo, se tiene el *Target Region Coverage Summary*. Este apartado presenta la gráfica que resume el porcentaje de pares de bases de las regiones genéticas estudiadas, que serán cubiertas por los oligonucleótidos usados para cada una de las regiones de interés.

Posteriormente, se encuentra el ítem *Amplicons Counts vs. Gaps Counts Chart*, en el cual se presenta la figura 11 que representa el número de amplicones y el número de GAPS. En las barras grises se presenta el número de amplicones y en las barras rojas el número de GAPS para cada región genética estudiada.

Finalmente se presenta el resumen de las características para cada región genética que será evaluada. A continuación, se describen brevemente las principales características:

- **Name Region:** Corresponde al nombre del gen evaluado. Aparecen varias regiones para el mismo gen porque se utilizan diferentes oligonucleótidos para la región objetivo, aumentando el tamaño de cobertura, lo que puede rescatar algunas regiones que no hayan sido previamente identificadas, brindando así mayor flexibilidad en el ensayo. Esto permite que se evalúe un número mayor de amplicones para la región genética deseada, aumentando así la posibilidad de hallar posibles variantes genéticas.

- **Target type:** Indica si la amplificación para la secuenciación se hizo dirigida a un exón o a una región genética completa. Generalmente en el target tipo Full Región se utilizan diferentes sondas que sobrelapan el mismo exón, buscando generar varios amplicones de la misma región, aumentando así las posibilidades de detección de posible mutación o cambios a nivel de la secuencia de ADN.
- **Chr:** Hace referencia al cromosoma en el cual se encuentra ubicado cada una de las regiones evaluadas.
- **Start/End:** Es la posición del número del nucleótido en el cual se inicia y finaliza la secuenciación.
- **Length:** Representa la longitud total en nucleótidos de la región estudiada.
- **Padding:** Hace referencia al relleno usado para incrementar el tamaño de la región de interés y mejorar la cobertura.
- **Coverage:** El porcentaje de pares de bases de las regiones genéticas objetivo que serán cubiertas por los oligonucleótidos.
- **Amplicons:** Corresponde al número de amplicones secuenciados sobre el número de amplicones que se tendrán para cada una de las regiones estudiadas.
- **GAPs:** Aunque este ensayo está diseñado para minimizar las interacciones poco específicas entre oligonucleótidos puede presentarse algunos GAPs (brechas). Los GAPS hacen referencia a fragmentos en la secuencia de interés que no pudieron ser secuenciados en el ensayo, es decir en donde ninguna lectura de secuencia pudo ser leída para una porción particular del genoma. Los GAPs pueden por varias razones: baja especificidad en la interacción entre oligonucleótidos, un contenido de GC en la región de interés fuera de los límites aceptables, o la presencia de SNPs que no se tuvieron en cuenta en el diseño del ensayo.
- **SNPs:** Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido), es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nucleotídica.
- **Avoid SNP:** Indica que en el diseño del ensayo se tuvo en cuenta la ubicación de los SNP conocidos, esto ayuda a rescatar regiones o SNPs no identificables y/o de baja frecuencia. El ensayo utiliza las bases de datos en las cuales se han descrito diferentes SNP, por ejemplo dbSNP 131 (humano hg19) para poder ubicar los oligonucleótidos en las posiciones de los SNPs conocidos, lo que mejora el rendimiento del ensayo.

El análisis de la información recogida en esta investigación se realizó en el paquete estadístico MedCalc Software. Análisis univariado: Para la caracterización poblacional se realizaron proporciones y medias con sus respectivas desviaciones estándar. Análisis bivariado: Para la estimación de la asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido y el fallo terapéutico a Adalimumab se calculó la *Odds Ratio*.

Consideraciones éticas: El ensayo se llevó a conformidad con el protocolo y la declaración de Helsinki (WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, s. f.), y la Conferencia Internacional sobre la Armonización («Conferencia Internacional Sobre Armonización (ICH)», 2007). El comité de ética e investigación del HPTU aprobó el protocolo (2016.088). La información recopilada de los registros clínicos y la intervención propuesta no conllevan el riesgo de causar daños biológicos, psicológicos o sociales. Debido a la naturaleza del estudio 51 y de acuerdo con las leyes colombianas (resolución número 8430 de 1993), este estudio ha sido considerado sin riesgo para los participantes.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Resultados frente a la determinación de variantes genómicas en pacientes colombianos con AR y análisis de su asociación con fallo terapéutico a Adalimumab en monoterapia o terapia combinada.

Como se observa en la Figura 12, se reclutaron un total de 227 pacientes con artritis reumatoide con un periodo de 36 meses (marzo 2017-marzo 2020), 22 se incluyeron en el estudio de secuenciación (Julio de 2018 hasta Agosto de 2019). Los pacientes seleccionados fueron emparejados por edad y sexo, el 100% tratado el con inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa Adalimumab, adherentes, raza latinoamericana, sin consumo de tabaco y alcohol.

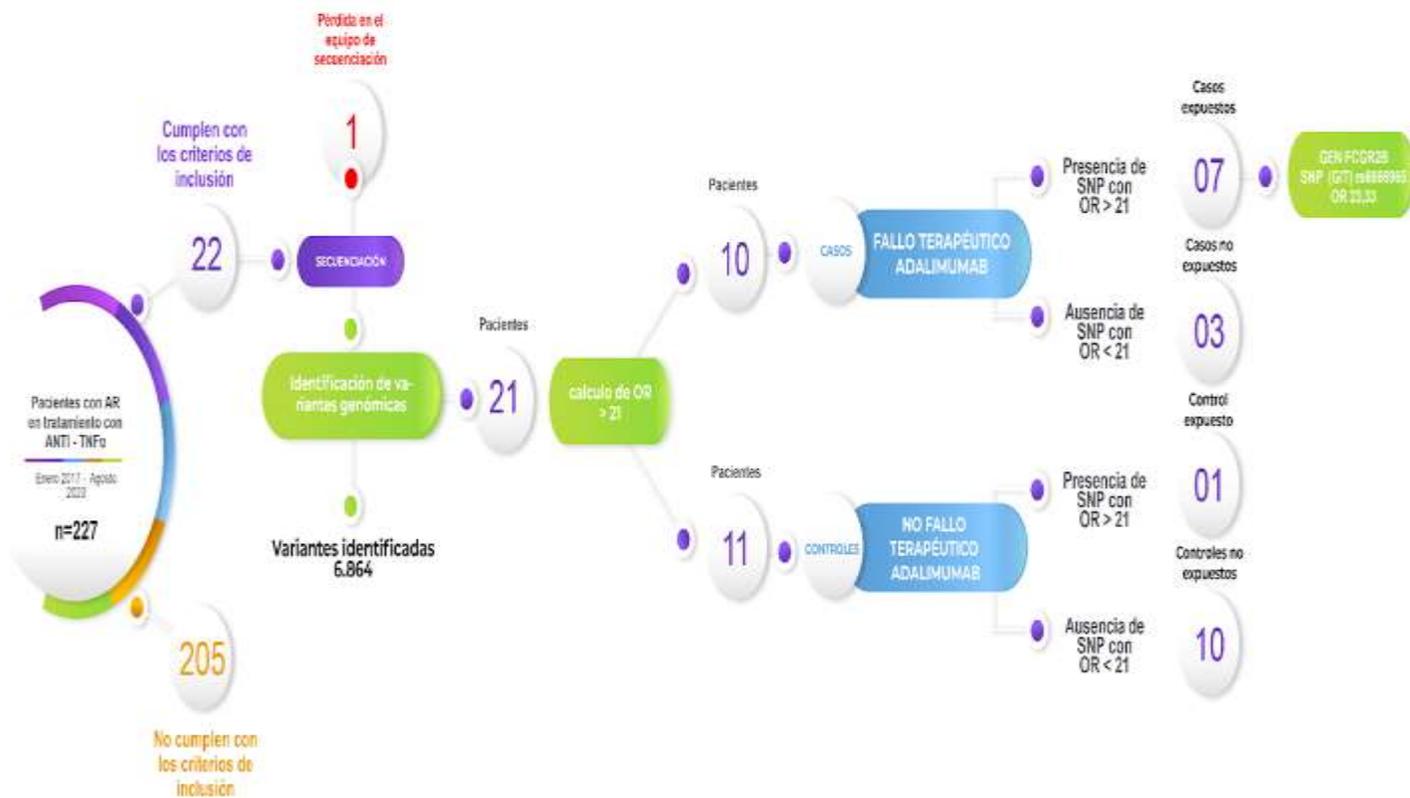


Figura 12. Población de estudio y variantes asociadas con fallo terapéutico

Los casos presentaban como desenlace de interés fallo terapéutico, mientras que los controles no. Se identificaron 6864 variantes (exposición) en la secuenciación genómica, de las cuales

según diseño de estudio las que presentaban una Odds Ratio mayor a 21 podrían asociarse al fallo terapéutico, como resultado la variante genómica SNP rs 6666965 del gen FCGR2B fue la única asociada con el fallo terapéutico a Adalimumab, ya que se encontró la variable de exposición en 7 casos y en 1 control con una Odds Ratio de 23,33. Es importante resaltar que otras variantes tuvieron Odds Ratio mayores a 15, pero no alcanzaron el mínimo requerido en el estudio, así que podrán analizarse en futuras investigaciones.

Las características sociodemográficas de los pacientes reclutados durante el estudio se presentan a continuación:

	Casos		Controles		P*
Características demográficas					
Edad, mediana (RIQ)	58	(10)	58	(7,5)	0,8644
Peso, mediana (RIQ)	58	(13)	64,5	(12,7)	0,1734
Talla, mediana (RIQ)	156	(9)	160	(13)	0,3688
IMC, mediana (RIQ)	22,8	(7,75)	26,12	(6,83)	0,3608
Sexo (Mujer)	9	(7)	9	(7)	0,3516
Escolaridad					
Primaria	9	(8)	7	(7)	0,2527
Secundaria	1		4		

Superior	1		0		
Enfermedades concomitantes					
Sí	8	(5)	10	(9)	0,1485
No	3		1		
Actividad física					
Sí	10	(9)	8	(5)	0,3406
No	1		3		
Antecedentes familiares					
Sí	9	(7)	6	(1)	0,923
No	2		5		

Tabla 3. Características sociodemográficas de los pacientes con AR

En cuanto a constantes sociodemográficas se encuentran el no consumo de alcohol y tabaco, la adherencia y la raza sudamericana. El emparejamiento entre casos y controles se presenta en la Tabla 4.

CASOS	EDAD	SEXO	ADALIMUMA B ADHERENCI A	TALLA	Peso	IMC	CONTROL ES	EDAD	SEXO	ADALIMUM AB ADHERENCI A	TALLA	PESO	IMC
CASO1	76	Mujer	Sí	147	68	31,47	CONTROL 1	76	Mujer	Sí	165	60,55	22,22
CASEO	57	Mujer	Sí	160	58	22,66	CONTROL 3	57	Mujer	Sí	160	68	26,56
CASO 4	30	Hombre	Sí	163	74	27,85	CONTROL 4	39	Hombre	Sí	166	57	20,69
CASO5	68	Hombre	Sí	156	55,5	22,81	CONTROL 5	67	Hombre	Sí	164	64,5	23,98
CASO6	74	Mujer	Sí	149	42	18,92	CONTROL 6	73	Mujer	Sí	150	68,5	30,44
CASO7	38	Mujer	Sí	156	62	25,48	CONTROL 7	40	Mujer	Sí	170	75,5	26,12
CASO8	58	Mujer	Sí	159	53	20,83	CONTROL 8	59	Mujer	Sí	149	49	22,07
CASO9	54	Mujer	Sí	163	53	19,95	CONTROL 9	56	Mujer	Sí	145	64	30,44
CASO10	55	Mujer	Sí	155	44,5	18,52	CONTROL 10	56	Mujer	Sí	155	54,5	22,68
CASO11	61	Mujer	Sí	150	64	28,44	CONTROL 11	58	Mujer	Sí	168	80	28,34
CASO 2	No se incluyó en el estudio						CONTROL 2	60	Mujer	Sí	157	74,5	30,22

Tabla 4 Emparejamiento casos y controles

4.2. Resultados frente a la identificación de variantes genómicas conocidas y no conocidas mediante secuenciación de próxima generación en pacientes colombianos con AR.

4.2.1. Genotipificación de las muestras en los genes de interés

Una vez tomada la muestra de sangre periférica en la entidad prestadora de servicios de salud, en el laboratorio Unigem se procedió a extracción del ADN, para el procesamiento de las muestras se procedió a realizar una captura de las regiones que comprenden un EXOMA-HUMANO utilizando el kit *Truesight one* de Illumina así como las regiones intrónicas flanqueantes. Las regiones fueron secuenciadas con tecnología Illumina. Las librerías y la secuenciación se hicieron en Unigem usando el equipo Miseq de Illumina, los datos se enviaron a través de Novogen para poder usar la plataforma Bitgenia.

Las lecturas pareadas obtenidas fueron alineadas contra el genoma de referencia de “*The Genome Reference Consortium*” en su versión 37 (GRCh37), por medio del *software Barrow Wheelers Aligner* (BWA). El procesamiento de las lecturas alineadas se llevó a cabo según las recomendaciones del Genome Analysis Toolkit (GATK). En primer lugar, se procedió a marcar las lecturas que puedan ser producto de duplicaciones de PCR por medio del software PICARD, se detectaron regiones con varias lecturas de baja calidad y se realizó un realineado local con el fin de detectar posibles deleciones o inserciones pequeñas. El siguiente paso consistió en detectar las diferencias entre el consenso de las lecturas obtenidas y el genoma de referencia, en un proceso denominado “llamado de variantes” (del inglés “*variant calling*”) mediante la herramienta “Haplotype Caller” de GATK. A partir de la información de calidad de las variantes se realizó un filtrado, con el protocolo “Hard Filtering”, según las recomendaciones detalladas por GATK, con el fin de detectar y filtrar aquellas variantes llamadas de baja calidad. Como último paso se procedió a anotar el VCF (vincular las variantes con datos biológicos) con información externa de bases de datos utilizando el paquete de software SnpEff/SnpSift. Para ello se utilizaron las siguientes fuentes: dbSNP, ExAC, 1000 Genomas para frecuencia poblacional, Clinvar para la relevancia clínica y Polyphen, SIFT y Mutation Taster para las predicciones de patogenicidad. El análisis del archivo de variantes (VCF) se realizó con el software B-platform.

4.2.2. Análisis de Datos Bioinformáticos

Se realizó la secuenciación de próxima generación y los datos fueron extraídos a una planilla de Microsoft Excel[®] mediante la plataforma bioinformática de BitGenia. Luego del procesamiento bioinformático de los datos provenientes de 21 se procedió a realizar el análisis de datos genómicos en la “_B Platform”.

Estos grupos de 21 pacientes con diagnóstico de "artritis reumatoide" y todos fueron tratados con el fármaco ADALIMUMAB que es un bloqueante de TNF- α .

Los pacientes fueron numerados del 1305 al 1326. Aquellos que presentaron fallo terapéutico, fallo significa que no se alcanzó la remisión del paciente con este medicamento, son los que fueron codificados del 1305 al 1315, y los que lograron eficacia, es decir, que si se logró la remisión de la enfermedad en el tratamiento con el fármaco, fueron los códigos del 1316 al 1326.

4.2.3. Análisis genes de AR y función del TNF

En esta etapa se amplió el proceso de análisis y genotipificación de ambos grupos para las variantes en los genes con asociación a AR y/o función de TNF, sobre los paneles provistos. El panel de genes se presenta en la tabla a continuación:

Lista de genes candidatos - AR y/o función de TNF
ACP5, CCL2, CCL3, CCL5, CD244, CIITA, CSF1, CTLA4, CTSK, FCRL3, FSTL1, HLA-DRB1, ICAM1, IFNG, IL10, IL15, IL17A, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL8, MMP1, MMP13, MMP3, NFKBIL1, OLAH, PADI4, PTPN22, S100A12, SAA1, SERPINH1, SLC22A4, STAT4, TLR2, TLR4, TNF, TNFAIP6, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFSF11, TNFSF13B

Tabla 5. Listado de genes candidatos

El procedimiento seguido aquí consistió en filtrar de los 21 casos todas las variantes encontradas en la lista de genes de asociación a AR y/o función de TNF y posteriormente genotipificarlas. En la figura 13 se observa el gráfico de los datos.

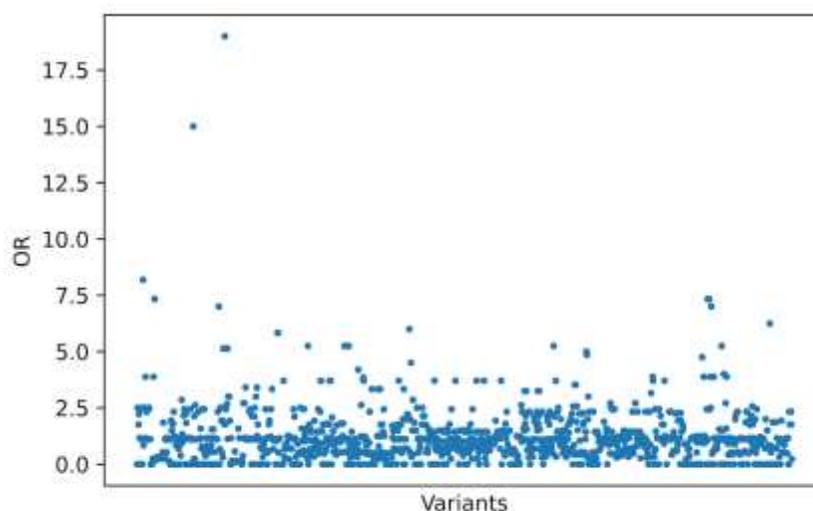


Figura 13 Variantes con scores más altos

De este análisis surgió que las variantes con scores más altos son, en orden descendente:

- 2:113535770 GGT>G del gen IL1A
- 1:114400195 G>GA del gen PTPN22
- rs653667 del gen TNFRSF1B
- rs57744451 del gen PADI4
- rs3758854 del gen MMP13
- rs10895372 del gen MMP13

4.2.4. Análisis genotipificación de las muestras en las variantes de interés

Se realizó el análisis del listado de rs (snp) para cada uno de los pacientes. Se determinaron los genotipos en cada uno de los grupos de pacientes.

Luego de disponibilizar en la plataforma, B platform, las variantes para cada paciente, se dividieron en dos grupos, los casos y los controles. Y así poder realizar un análisis en conjunto, como un estudio múltiple, con la estadística correspondiente por grupo.



<input type="checkbox"/>	AR todos	unigem
	multiple - 21 GRCh37 - SureSelect All Exon V6	
<input type="checkbox"/>	AR controles	unigem
	multiple - 11 GRCh37 - SureSelect All Exon V6 - Pacientes que lograron eficacia.	
<input type="checkbox"/>	AR casos	unigem
	multiple - 10 GRCh37 - SureSelect All Exon V6 - Pacientes que presentaron fallo terapéutico.	

Figura 14: Lista de estudios en la plataforma.

Lo primero que se realizó fue la validación de los 6864 códigos rs. Este paso fue necesario porque varias variantes estaban desactualizadas, es decir, no tenían los códigos actualizados. Los códigos rs en la base de datos dbSNP se actualizan y se van unificando en rs nuevos. Entonces el primer paso lo que se hizo fue normalizar los códigos de las variantes.

Una vez obtenida la lista de variantes validada, el siguiente paso fue el reprocesamiento de las 21 muestras para poder generar un archivo GVCF, que consistió en la interrogación de cada una de las posiciones genómicas de los rs.

Obtenido el GVCF se identificó para cada muestra en cada variante (rs) si esa posición había sido cubierta o no por la secuenciación y su genotipo. Si en esa posición la muestra fue homocigota para la referencia, se indicó “0/0”. En los casos en los que la cantidad de lecturas que cubrían la posición fuera menor que 10, se colocó un asterisco al lado del genotipo, por ejemplo, “0/0*”.

Los resultados de la genotipificación de las variantes se encuentran en la planilla llamada “Base de datos Genotipificación.xls”, que posteriormente se incorporó a la nueva herramienta farmacogenómica diseñada con la investigación.

4.3. Establecer la asociación de variantes genómicas identificadas con el fallo terapéutico a Adalimumab en pacientes colombianos con AR

Por último, se realizó un gráfico de dispersión para poder identificar las variantes en las que la diferencia entre los casos y los controles es más significativa. El estadístico utilizado para construir el gráfico fue el *odds ratio* (OR).

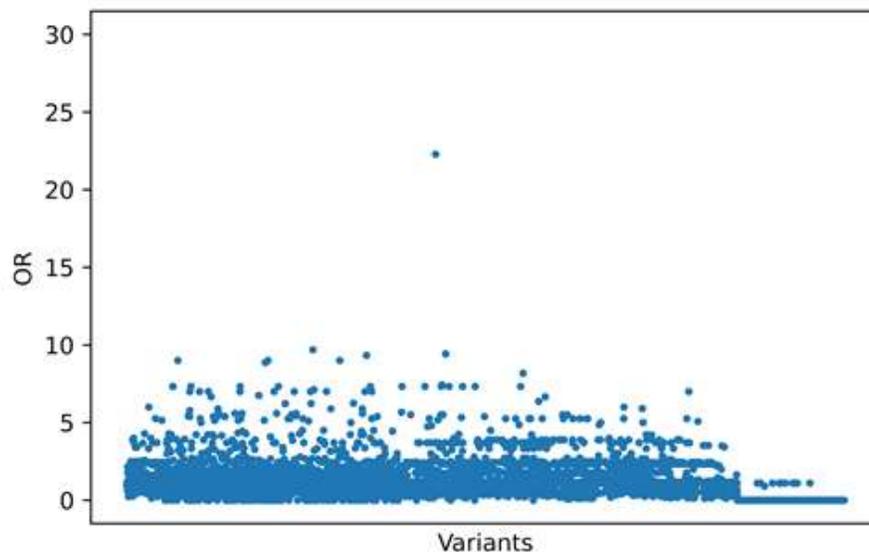


Figura 15: Gráfico de dispersión de variantes

En el gráfico se observa el OR para cada variante. Esto es un estimador del riesgo de presentar fallo terapéutico, dado que se posee la variante. Por lo tanto, en las variantes con OR más altos hay una asociación más fuerte entre la variante y presentar fallo terapéutico.

De este análisis se puede observar que las variantes con los OR más altos son, en orden descendente: rs6666965, rs3933769, rs4778636, rs61801822, rs78763831.

Gen	Variante	Efecto Variante	SNP	Odds ratio	95 % intervalo de confianza	Z statistic	Nivel de Significancia	Número y porcentaje de pacientes
FCGR2B	G -> T	Variante Intrónica	rs6666965	23.3	2.0 to 273.3	2.509	P = 0.0121	8 (38%)
FCGR3A	C -> T	Variante Intragénica	rs78763831	17.8	0.8 to 377.4	1.846	P = 0.065	16 (76%)
FCGR3A	C -> T	Variante Intragénica	rs61801822	17.8	0.8 to 377.4	1.846	P = 0.065	16 (76%)
IL16	G -> A	Variante Intrónica	rs4778636	15.9	0.7 to 345.1	1.764	P = 0.0778	1 (4%)
FCGR3A	A -> G	Variante Intragénica	rs3933769	7.5	0.7 to 81.3	1.657	P = 0.0974	14 (66%)

Tabla 6: Variantes con los OR más altos de fallo terapéutico.

4.4 Resultados frente al diseño de una base de datos integral de variantes genómicas en pacientes colombianos con artritis reumatoide identificando posibles biomarcadores en los estudios bioinformáticos

4.4.1 Estudio de factores genéticos de susceptibilidad

La tercera etapa consistió en la búsqueda y análisis de estudios previos de asociación (GWAS) en la base de datos GWAS Catalog asociados a TNF- α y AR (o trastornos autoinmunes) que nos permitan obtener otros SNPs y poder estudiar y genotipificar en ambos grupos de pacientes todos los SNPs correspondientes.

En el análisis funcional de las variantes encontradas y búsqueda de diferencias significativas entre ambos grupos, se construyó un *score* como medida del riesgo genético de desarrollar la enfermedad, utilizando las variantes encontradas en GWAS Catalog. El score asociado a cada muestra podría servir para encontrar alguna correlación entre el riesgo genético de desarrollar la enfermedad y el resultado del tratamiento.

Hay más de 1000 entradas en GWAS Catalog asociadas a esta enfermedad. Nos quedamos con las que tuvieran un p-valor menor a 10^{-9} y un valor de *odds ratio* asociado para poder construir un score que sirva como medida del riesgo genético de desarrollar la enfermedad. Además, las variantes utilizadas están en desequilibrio de ligamiento para que el efecto de cada una sea independiente.

Se utilizaron entonces las siguientes variantes seleccionadas de GWAS Catalog para el cálculo de riesgo de artritis reumatoide, las cuales son variables en el grupo en estudio:

VARIANTE	GEN	ALELO DE RIESGO	OR
rs2476601	PTPN22	A	1.80
rs30187	ERAP1	T	1.29
rs11209026	IL23R	G	1.65
rs33980500	TRAF3IP2	T	1.95
rs41299637	C1orf106	T	1.20
rs13397	TMEM187	A	1.27
rs2843401	MMEL1	C	1.24
rs1893592	UBASH3A	A	1.11
rs2812378	CCL21	G	1.12
rs10985070	PHF19	C	1.08

Tabla 7: Cálculo riesgo AR

De estos 10 genes reportados como contribuyentes al desarrollo de artritis reumatoide, solo PTPN22 estaba incluido en la lista original de 43 genes candidatos. Es importante mencionar que ninguna de estas variantes se encuentra entre las variantes más significativas encontradas en el análisis anterior.

Utilizando el valor de *odds ratio* reportado para cada una de estas variantes se calculó un score de riesgo de artritis reumatoide, para ver si existe una correlación entre el riesgo de desarrollar la enfermedad, y la eficiencia del tratamiento. El *score* de un paciente es luego la productoria de los OR de cada variante, ajustados por la prevalencia (prev). El OR de cada variante es OR_{RR}^{2prev} para el homocigota de riesgo, OR_{QR}^{prev} para el heterocigota y OR_{QQ} para el homocigota de referencia (no riesgo). La prevalencia se calcula de la siguiente manera:

$$prev = \frac{OR_{QQ}(1-P(R))^2 + OR_{QR}2P(R)(1-P(R)) + OR_{RR}P(R)^2}{2P(R)(1-P(R)) + P(R)^2}$$

donde P(R) es la frecuencia poblacional del alelo de riesgo. Este cálculo asume el equilibrio de Hardy–Weinberg.

El score de riesgo obtenido para cada muestra es el siguiente

PACIENTE	SCORE
1307	35.986634
1315	18.222261
1316	16.439478
1308	15.677894
1311	10.694468
1313	8.359126
1325	7.437694
1305	6.481496
1323	6.001385
1322	5.418239
1314	5.339122
1310	5.133993
1312	4.422716
1317	3.894896
1324	3.890475
1318	3.693478
1326	2.925604

1309	2.553730
1320	2.281158
1319	2.055097
1321	1.977337

Tabla 8: Score de Riesgo vs Fallo terapéutico

Los pacientes en las filas resaltadas en color gris presentaron fallo terapéutico, mientras que los de las filas sin resaltar lograron eficacia.

Parecería a simple vista que los individuos con fallo terapéutico tienen *scores* más altos:

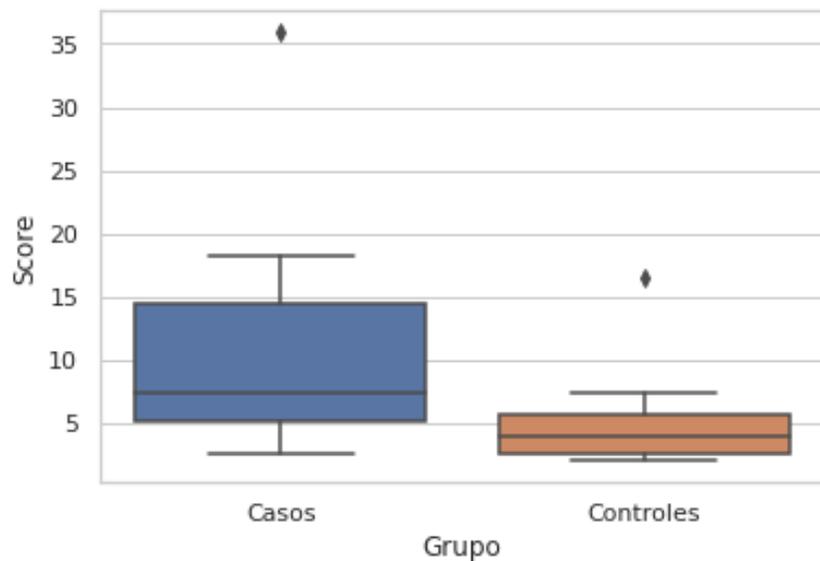


Figura 16: Score entre Casos y Controles de Fallo Terapéutico

Para evaluar la significancia de esta correlación se realizó un ANOVA.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	p-valor
Grupo	201.020344	1	3.544204	0.075159

Residual	1077.642823	19	
----------	-------------	----	--

Tabla 9: Significancia de correlación fallo terapéutico

El p-valor no significativo indica que no existe una diferencia significativa entre grupos. Esto posiblemente sería diferente si la cantidad de muestras fuera mayor. Con estos datos no podemos decir que haya diferencias significativas.

Además, se realizó la búsqueda de información en PharmGKB de anotaciones asociadas a ADALIMUMAB. Se analizó el genotipo de cada paciente en relación a la variante rs1800629 que es la de mayor nivel de evidencia (2B).

Como resultado se encontró lo siguiente con relación al Adalimumab: En la base de datos de farmacogenómica PharmGKB hay varias anotaciones clínicas de nivel 3 y 4. Una sola de nivel 2B (evidencia moderada): la rs1800629 del gen TNF, relacionada con eficacia.

GENOTIPO	FENOTIPO
AA	Menor probabilidad de mejora que AG y GG.
AG	Mayor probabilidad de mejora que AA y menor que GG.
GG	Mayor probabilidad de mejora que AA y AG.

Tabla 10: Evidencia de eficacia relacionada con el Adalimumab el el rs 1800629

Todos los pacientes del estudio tienen genotipo GG excepto 1305, 1309 y 1313 que tienen genotipo AG y pertenecen al grupo con fallo terapéutico.

4.4.2. Análisis Funcional

Finalmente se realizó el análisis funcional de las variantes. Se buscaron variantes con probada asociación de patogenicidad dentro de los genes relacionado con el diagnóstico de AR. Se filtraron las variantes patogénicas o probablemente patogénicas según la clasificación de ClinVar y ACMG

para cada uno de los casos y controles. Esta búsqueda se realizó sobre la lista de genes iniciales, a la cual se le agregaron los genes asociados a riesgo de AR tomados de GWAS y los genes de las aproximadamente 6000 variantes identificadas en la secuenciación.

No se encontraron alteraciones genéticas reportadas previamente como patogénicas, probablemente patogénicas o variantes VUS (de significado incierto) con características relevantes que pudieran justificar el cuadro clínico observado.

Lista de genes (316) de las variantes secuenciadas

AC005493.1, AC005549.3, ACAN, ACP5, ADAM17, ADAMTS4, AL137026.1, ALOX5, ANGPT1, ANXA1, ANXA5, AP000350.10, AP000350.4, APOH, ATIC, ATP6V1G2, ATP6V1G2-DDX39B, B9D2, BCL9L, BST1, BTLA, BTNL2, C19orf68, C1orf167, C1orf204, CARD8, CAST, CAT, CCDC22, CCDC97, CCL2, CCL20, CCL3, CCL4, CCL5, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCRL2, CD244, CD28, CD4, CD40, CD40LG, CD44, CD69, CD79A, CD80, CD86, CHI3L1, CIITA, CILP, CLCN6, CLEC16A, COL18A1, COL2A1, COMP, CR1, CRP, CRTCL1, CSF1, CSF1R, CSF2, CTD-2337A12.1, CTLA4, CTSB, CTSG, CTSK, CTSL, CTSO, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL10, CXCL12, CXCL5, CXCL6, CXCL9, CXCR3, CXCR4, CXCR5, DDC8, DDX39B, DHODH, ELANE, ENO1, ERAP1, FAM211A, FAM211A-AS1, FAS, FASLG, FBXL19-AS1, FBXL21, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B, FCRL3, FLG, FLG-AS1, FLT1, FOLR2, FOS, FOXP3, FSTL1, GNAQ, GPI, GPX3, H19, HAS1, HLA-B, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HMGB1, HNRNPUL1, HOXC11, HP, HSPA5, HSPD1, HSPE1, HSPE1-MOB4, HTRA1, IAH1, ICAM1, IL10, IL11, IL13, IL15, IL16, IL17A, IL17RA, IL18, IL18BP, IL18R1, IL19, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RN, IL2, IL22, IL22RA1, IL23A, IL23R, IL26, IL2RA, IL2RB, IL32, IL37, IL4, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IRF5, ITGAL, ITGB2, JAM3, JUN, LACC1, LECT2, LIF, LRRK2, LTA, LTB, MALAT1, MAP3K8, MAPK1, MAPK14, MAPK8, MBL2, MCCD1, MICB, MIF, MIR146A, MMP1, MMP12, MMP13, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MOB4, MPO, MRPL49, MTHFR, NFKBIA, NFKBIL1, NLRP1,

NOS2, NPSR1, NR3C1, NR4A2, NUMA1, OLAH, OSM, PADI4, PAQR6, PDCD1, PIK3CG, PLA2G2A, PLEKHG6, PPP1CC, PRRC2A, PRTN3, PTGS1, PTGS2, PTH, PTPN22, REL, RELB, RETN, RP11-986E7.7, S100A9, SAA1, SAA4, SDHD, SELE, SELE, COL18A1, SELL, SERPINA3, SERPINH1, SH2D1A, SIAE, SIGLEC1, SLAMF8, SLC11A1, SLC19A1, SLC22A4, SPA17, SPP1, SRF, STARD5, STAT4, STEAP4, SUPT20H, SYK, SYN1, SYVN1, TAGAP, TBRG1, TEK, TEX13A, TFRC, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, TIMP2, TLR2, TLR4, TLR9 TLR9, TNF, TNFAIP6, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFRSF13C, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFSF11, TNFSF12-TNFSF13, TNFSF13, TNFSF13B, TNIP1, TRAF1, TTR, TWF2, VCAM1, VEGFA, ZC2HC1A, ZFAS1, ZNF114, ZNF334, ZNFX1
<i>Lista de genes candidatos (43) - AR y/o función de TNF</i>
ACP5, CCL2, CCL3, CCL5, CD244, CIITA, CSF1, CTLA4, CTSK, FCRL3, FSTL1, HLA-DRB1, ICAM1, IFNG, IL10, IL15, IL17A, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL8, MMP1, MMP13, MMP3, NFKBIL1, OLAH, PADI4, PTPN22, S100A12, SAA1, SERPINH1, SLC22A4, STAT4, TLR2, TLR4, TNF, TNFAIP6, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFSF11, TNFSF13B
<i>Lista de genes candidatos (10) - AR - GWAS</i>
TRAF3IP2, CCL21, IL23R, ERAP1, PTPN22, MMEL1, UBASH3A, TMEM187, PHF19, INAVA(C1orf106)

Tabla 11: Listado de genes candidatos y de genes de las variantes secuenciadas.

La cobertura de este examen fue suficiente para asegurar buena calidad en la totalidad de las secuencias blanco del exoma. Particularmente, las regiones codificantes de los genes analizados se cubrieron en un 100%.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En cuanto a la *identificación de variantes genómicas conocidas y no conocidas mediante secuenciación de próxima generación en pacientes colombianos con AR*; se logró analizar variantes genómicas SNP de los pacientes con AR incluidos en el estudio, logrando el registro de los SNP aún no reportados en bases genómicas (dbSNP) y la normalización de 6864 variantes genómicas en total. Además se identificaron los score más altos de los genes de AR y función del TNF, destacando en la población colombiana de estudio las variantes genómicas: 2:113535770 GGT>G del gen IL1A, 1:114400195 G>GA del gen PTPN22, rs653667 del gen TNFRSF1B, rs57744451 del gen PADI4, rs3758854 del gen MMP13, rs10895372 del gen MMP13; esta información es relevante para futuras investigaciones de variantes genómicas. También, como se observa en los resultados, adicional a la variante asociada al fallo terapéutico a Adalimumab; se identificaron otras variantes genómicas SNP como rs78763831, rs61801822, rs4778636 y rs3933769 que no son estadísticamente significativas, pero pueden ser de gran utilidad para el estudio de haplotipos asociados a la eficacia de los FARMEb.

Frente al *establecimiento de la asociación de variantes genómicas identificadas con el fallo terapéutico a Adalimumab en pacientes colombianos con AR* se observa que en diferentes estudios el gen FCGR2A presenta un polimorfismo con actividad significativa en la eficacia de adalimumab (Wen Z, 2021), (Mikhaylenko DS, 2020). A diferencia de nuestro estudio, el SNP identificado fue rs1801274, sin embargo, el SNP rs6666965, se encuentra en el mismo gen FCGR2B, por lo que puede tener características similares en adalimumab y otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (Mikhaylenko DS, 2020), lo cual sirve para buscar haplotipos en el mismo gen. El estimador de riesgo utilizado fue *Odds Ratio* (OR) y su interpretación se deriva de la fuerza de asociación entre los SNP encontrados en los pacientes y el grado de fallo terapéutico del tratamiento. Particularmente en este estudio, se encontró que los SNPs con OR más altos eran: rs6666965, rs3933769, rs4778636, rs61801822, rs78763831. Sin embargo, el SNP rs6666965 fue el único que demostró una fuerte asociación relacionada con el fallo terapéutico del tratamiento con adalimumab ($p = 0,0121$).

En lo referente *al diseño de una base de datos integral de variantes genómicas en pacientes colombianos con artritis reumatoide* identificando posibles biomarcadores en los estudios bioinformáticos, se generó la primera base de datos farmacogenómicos incluyendo variantes genéticas pacientes colombianos con artritis reumatoide, los cuáles se compartieron con diferentes plataformas bioinformáticas y permitieron la creación de un desarrollo tecnológico que permite generar alertas de acuerdo con la información genómica del paciente en la medida que se asocian variantes genómicas con el fallo terapéutico.

En cuanto a la *determinación de variantes genómicas en pacientes colombianos con AR y análisis de su asociación con fallo terapéutico a Adalimumab* en monoterapia o terapia combinada; tal como se observa en los resultados pacientes colombianos con AR, que presenten variantes genómicas en el gen FcGR2B, en especial el polimorfismo rs6666965 podrían tener fallo terapéutico a Adalimumab; dada la asociación de dicho polimorfismo con el fallo terapéutico al antiTNF α Adalimumab que se determinó en el presente estudio.

Este nuevo hallazgo sirve como base para futuras investigaciones de determinación de posibles biomarcadores predictores de respuesta a Adalimumab; contribuyendo desde la farmacogenómica, a la medicina de precisión para que los pacientes reciban de manera personalizada sus tratamientos farmacológicos evitando el fallo terapéutico y contribuyendo a mejorar las condiciones de salud de la población con AR.

Desde un punto de vista mecanicista, esta variante genómica de tipo intrónico identificada en el estudio, puede asociarse con el fallo terapéutico a Adalimumab porque afecta la síntesis correcta de la proteína que codifica el gen FcGR2B, dicha proteína codificada por este gen es un receptor de baja afinidad por la región Fc de los complejos de inmunoglobulina gamma, está involucrada en la fagocitosis de complejos inmunes y en la regulación de la producción de anticuerpos por parte de las células B. (Breunis WB, 2009) Las variaciones en este gen pueden afectar la respuesta de anti TNF como el Adalimumab.

La posible relación entre adalimumab y el mencionado SNP puede existir en la interacción del fármaco con la capacidad inhibitoria en el funcionamiento de la inmunoglobulina G debido al gen

FcGR2B; ya que los receptores FC gamma (FcγR) se unen a la región constante de la inmunoglobulina G y ésta transmite señales tanto estimulantes como inhibitoras a las células inmunes según sea necesario. (Karimifar M, 2021). En uno de los genes FcγR, el FcGR2B contiene el polimorfismo rs 6666965. El adalimumab modula la respuesta biológica inducida por TNF y reduce las concentraciones de IL-6. Además, al ser un anticuerpo monoclonal de origen humano, se une al TNF circulante y de la superficie celular, bloqueando la interacción entre el TNF-α y los receptores p55 y p75.

El SNP rs6666965 se describió en un estudio de secuenciación de genes que codifican receptores gamma de Fc en una población coreana. La expresión de este SNP junto con rs12117530 y rs1050501 fue significativamente mayor en pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES). (Karimifar M, 2021) Algunas de las manifestaciones clínicas encontradas en estos pacientes fueron disminución del complemento, linfopenia y anticuerpos anti-dsDNA y trombocitopenia. Actualmente, no existe suficiente información sobre el rs6666965 y su asociación en la práctica clínica, pero es importante destacar su presencia en enfermedades autoinmunes con cambios importantes en la fisiopatología de la enfermedad.

Además, es importante mencionar que el proceso de codificación de proteínas se realiza a través de los ARNm maduros, pero antes de llevar a cabo este proceso se debe realizar la eliminación de los intrones dentro de los ARNm primarios mediante el *splicing* de exones. Este proceso puede tener alteraciones dadas por mutaciones y la intervención de SNP en los sitios de empalme, potenciadores o inhibidores de corte. (Vaz-Drago, 2017) Sin embargo, es adecuado mencionar que el proceso fisiopatológico por el cual las modificaciones y deleciones intrónicas afectan el proceso de codificación de proteínas en el contexto de la respuesta modificadora al tratamiento con Adalimumab en pacientes con artritis reumatoide, requiere de nuevas investigaciones.

Existen importantes limitaciones en el estudio de la farmacogenética y la farmacogenómica, y sus implicaciones para la variabilidad de la respuesta a los fármacos en la práctica clínica. Actualmente, existen muy pocos estudios a nivel mundial sobre estos temas y específicamente, en Colombia, no existen estudios relacionados con las respuestas clínicas individuales a los anticuerpos monoclonales en pacientes con diagnóstico de AR, de aquí la relevancia de este primer estudio.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Tal como se presenta en los resultados y en la discusión, el SNP rs6666965 del gen FcGR2B se asocia con el fallo terapéutico a Adalimumab y sirve como base para nuevas investigación de haplotipos del mismo gen o de biomarcadores tipo variante genómica.

El diseño de panel para la respuesta de medicamentos en la artritis reumatoide, realizado mediante la técnica *TruSeq Custom Amplicon* permitió el descubrimiento de variantes genéticas no reportadas y la validación o corrección de las ya reportadas.

A partir de herramientas bioinformáticas, se puede extraer la información relevante de las variantes genéticas de los individuos y generar bases de datos farmacogenómicas para predecir la respuesta a medicamentos, utilizada en diferentes plataformas bioinformáticas y en el desarrollo de productos tecnológicos predictores de respuesta a medicamentos.

Dentro de la lista de genes y variantes analizada, se encontraron algunas cuyo efecto sobre el tratamiento con adalimumab es relativamente mayor. Estas variantes son candidatas para ser estudiadas con mayor profundidad para verificar que están involucradas en la respuesta al tratamiento.

En cuanto al score de riesgo desarrollado, no se encontró una diferencia significativa entre los casos con fallo terapéutico y los controles con eficacia. Sin embargo, esta prueba posiblemente esté influenciada por el bajo número muestral. Un estudio similar con un mayor número de pacientes probablemente arroje resultados más firmes.

7. REFERENCIAS

- A., G. (Marzo de 2011). Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. [*New criteria for the classification of rheumatoid arthritis*]. Reumatol Clin. doi:10.1016/j.reuma.2011.01.002. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria
- AGARWAL, S. K. (2008). *Predictors of Discontinuation of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis*. *The Journal of Rheumatology*. doi:1737-1744
- Alimentos, I. N. (2016). Programa nacional de farmacovigilancia. 5(1). Obtenido de https://www.invima.gov.co/images/pdf/farmacovigilancia_alertas/boletines/2016/Farmas
- Álvarez, M. M. (2018). Farmacogenómica: la medicina personalizada. 147-154. ScienceDirect .
- Andrés, A. I. (23 de Marzo de 2010). Farmacogenética Y Variabilidad Interindividual En La Respuesta A Los Medicamentos. . Academia de farmacia “Reino de Aragón” Zaragoza. Recuperado el 05 de Abril de 2016, de <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/documentos/documento21.pdf>
- Arora, A. M. (2013). *Long-Term Drug Survival of TNF Inhibitor Therapy in RA Patients: A Systematic Review of European National Drug Registers*. *International Journal of Rheumatology*. doi:10.1155/2013/764518
- Arora, A. M. (2013). Long-Term Drug Survival of TNF Inhibitor Therapy in RA Patients: A Systematic Review of European National DrugRegisters. *International Journal of Rheumatology*. (2013,764518).
- Aterido, A. C. (2019). Un análisis transcriptómico y genómico combinado identifica una firma genética asociada con la respuesta a la terapia anti-TNF en la artritis reumatoide. *10. Immunol Frontal*.
- Balsa, A. (05 de Marzo de 2011). Definiendo la remisión en la artritis reumatoide: nuevos criterios de laACR/EULAR. Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, Reumatología. Madrid, España.: Universidad Autónoma de Madrid. doi:10.1016/j.reuma.2010.10.006
- Bek, S. B. (2017). Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *The pharmacogenomics journal*. 17(5), 403-411.
- Bluett, J. &. (2017). Medicina de precisión en artritis reumatoide. 377-387. Elsevier.
- Calabresi E, P. F. (2018). One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. . 36, 2, 175-184.
- Camaño, L. P. (2020). Afectación bucal en pacientes con artritis reumatoide. *Revista Cubana de Reumatología*.

- Caskey, C. T. (s.f.). *Using Genetic Diagnosis to Determine Individual Therapeutic Utility. The Brown Foundation Institute of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center* (Vols. Vol. 61: 1-15). Houston, Texas: Annual Review of Medicine. . doi:10.1146
- Castro, K. E. (2019). Úlcera corneal grave secundaria a artritis reumatoide. . Revista médica electrónica de Ciego de Ávila.
- Castro-Santos P, L. C.-P. (2015). Genomics, proteomics and metabolomics: their emerging roles in the discovery and validation of rheumatoid arthritis biomarkers. 33(2):279-86. Clin Exp Rheumatol.
- Chatzidionysiou, K., & Sfikakis, P. P. (2019). Low rates of remission with methotrexate monotherapy in rheumatoid arthritis: review of randomised controlled trials could point towards a paradigm shift. RMD Open, 5(2), e000993. doi:10.1136/rmdopen-2019-000993
- Claudia Mora, J. D. (2009). *Costos directos de la artritis reumatoide temprana en el primer año de atención: simulación de tres situaciones clínicas en un hospital universitario de tercer nivel en Colombia* Revista Biomédica (Vols. Vol. 29, Núm. 1).
- Colciencias. (s.f.). Grupo de trabajo de la Guía para la Detección Temprana, Diagnóstico y Tratamiento de la Artritis Reumatoide. Sistema General de Seguridad Social. Ministerio de Salud y Protección Social. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/gpc-tratamiento-artritis-reumatoide-completa.pdf>
- Cuenta de alto costo: Fondo colombiano de enfermedades de alto costo. (s.f.). Recuperado el 15 de septiembre de 2022, de <https://cuentadealtocosto.org/site/artritis/artritis-reumatoide-una-enfermedad-que-afecta-laproductividadlaboral/#:~:text=De%20los%2034.644.208%20adultos,un%20hombre%20padece%20esta%20enfermedad.>
- Cuenta de alto costo: Fondo colombiano de enfermedades de alto costo. (09 de Diciembre de 2020). *Bogotá: Cuenta de alto costo.* Bogota. Obtenido de <https://cuentadealtocosto.org/site/artritis-reumatoide/>
- Cuppen, B. W. (2015). Tratamiento biológico personalizado para la artritis reumatoide: una revisión sistemática con un enfoque en la aplicabilidad clínica. Reumatología (Oxford).
- Daniel G. Fernández-Ávilaa, , D.-R.-M. (s.f.). Prevalencia de la artritis reumatoide en Colombia según información del Sistema Integral de Información de la Protección Social. 26(2), 83-87. Revista Colombiana de Reumatología. doi:10.1016/j.rcreu.2019.01.003
- Darren, D., & Rielly, P. R. (2010). *Pharmacogenetics of rheumatoid arthritis: Potential targets from susceptibility genes and present therapies. United Kingdom. Journal Title: Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* Dove Medical Press. doi:ISSN:1178-7066

- Deane, K. D. (2020). Rheumatoid Arthritis: Pathogenesis, Prediction and Prevention - An Emerging Paradigm Shift. *Arthritis & Rheumatology*. doi:10.1002/art.41417
- Deepali, S. M. (2019). Farmacogenómica poblacional para la salud pública de precisión en Colombia. *Frontiers in Genetics*.
- Degboé, Y. S. (2020). Background Glucocorticoid Therapy Has No Impact on Efficacy and Safety of Abatacept or Adalimumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Medici*.
- Desai, R. D. (2020). Comparative Risk of Diabetes Mellitus in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Biologic or Targeted Synthetic Disease-Modifying Drugs: A Cohort Study. *ACR Open Rheumatology*.
- Evangelatos, G. F. (2019). MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact. *Autoimmunity Reviews*. doi:102391
- F.C. Breedveld, M. W. (2006). The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous. *54*. doi:10:1002/art.21519
- Falconer J, M. A. (Julio de 2018). Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. *70*, 7, 984-999. doi:10.1002/art.40504. Epub 2018 Jun 4. PMID: 29
- Fernández-Ávila, D. G.-R.-M. (2019). Prevalencia de la artritis reumatoide en Colombia según información del Sistema Integral de Información de la Protección Social. 83-87. *Revista Colombiana de Reumatología*, .
- Fidel Ortega-Ortiz Apodaca (Ed.). (2010). Biomarcadores:analítica, diagnóstico y terapéutica, Monografía XXX de la Real Academia Nacional de FarmaciaENTOX/TIWET (The Faculty of the Department of Environmental Toxicology and The Institute of Wildlife and Environmental Toxicology-Clemson University. 883-905. USA.
- Firestein GS, M. I. (Febrero de 2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2017.02.006. PMID: 28228278; PMCID: PMC5385708.
- Fleischmann, R. W. (2019). Eficacia de abatacept y adalimumab en pacientes con artritis reumatoide temprana con múltiples factores de pronóstico precario: análisis post hoc de un ensayo clínico controlado aleatorizado (AMPLE). 559-571. Springer Healthcare.
- G., P. (2011). Bring on the biomarkers. *Nature*. 469(1): 156-157.
- G., W. (2005). Drug metabolism and variability among patients in drug response. *352*, 2211-2221. *N Engl JMed*.

- Gabay, C. B. (2020). Sarilumab and adalimumab differential effects on bone remodelling and cardiovascular risk biomarkers, and predictions of treatment outcomes. . *Arthritis Research & Therapy*.
- Gallardo-Solarte K, B.-A. F.-J. (2016). *Costos de la enfermedad crónica no transmisible: la realidad colombiana*. *Rev Cienc Salud*. (Vols. 14(1):103-114.). doi:dx.doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.09
- Gary S Firestein, M., & Monica Guma, M. P. (s.f.). Pathogenesis of rheumatoid arthritis. . Recuperado el 20 de Octubre de 2020
- Goulielmos, G. Z. (2016). Datos genéticos: el nuevo desafío de la medicina personalizada, conocimientos para pacientes con artritis reumatoide. 90-101. Elsevier.
- H., V. (2001). Review: Use of biomarkers in risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. 204(2-3): 91-102.
- Hamann, P. P. (2019). Predictors, demographics and frequency of sustained remission and low disease activity in anti-tumour necrosis factor treated rheumatoid arthritis patients. (58), 2162. *Rheumatology*.
- Harrold, L. G. (2020). Seguridad a largo plazo y en el mundo real del adalimumab en la artritis reumatoide: análisis de un registro prospectivo con sede en EE. UU. 959-967. *The Journal of Rheumatology*.
- Howard L McLeod, W. E. (s.f.). *PHARMACOGENOMICS: Unlocking the Human Genome for Better Drug Therapy*. *Department of Medicine, Division of Oncology, Washington University Medical School* (Vols. Vol. 41: 101-121 (Volume publication date April 2001)). St. Louis, Missouri.: Annual Review of Pharmacology and Toxicol. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.101
- Johnson J., C. L. (2013). Pharmacogenetics and cardiovascular disease-implications for personalized medicine. *Pharmacol Rev* . 65, 987.
- Jonathan Kay, K. S. (1 de Diciembre de 2012). ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria, *Rheumatology*. 51, Pages vi5–vi9. doi:10.1093/rheumatology/kes279
- Kalden, J. R.-K. (2017). Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. . (13(12), 707.). *Nature Reviews Rheumatology*.
- Kotyla, P. J. (2018). Bimodal function of anti-TNF treatment: shall we be concerned about Anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis and heart failure?. (19(6), 1739). *International journal of molecular sciences*.
- Koushik, S. J. (2017). PAD4: pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 21, 4, 433–447. doi:10.1080/14728222.2017.1294160

- Levin AD, W. M. (Agosto de 2016). Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. doi:doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw053. Epub 2016 Feb 19. PMID: 26896086.
- Ling, S. N. (2020). Proteomic analysis to define predictors of treatment response to adalimumab or methotrexate in rheumatoid arthritis patients. 516-523. *The Pharmacogenomics Journal*.
- Liu, M. D. (2018). Identification of HLA-DRB1 association to adalimumab immunogenicity. Research Article.
- Lock EA, B. J. (2008). Biomarkers in translation; past, present and future. *Toxicology* . 245(3):163-166.
- Magill, L. A. (2018). Bajo porcentaje de células B de memoria de proteína reguladora de señal $\alpha / \beta +$ en sangre predice el desarrollo de anticuerpos antidrogas (ADA) en en pacientes con artritis reumatoide tratados con adalimumab. *Front Immunol*. 9.
- Meroni PL, V. G. (Abril de 2014). Tumour necrosis factor α antagonists in the treatment of rheumatoid arthritis: an immunological perspective. *BioDrugs*. doi:doi: 10.1007/s40259-013-0063-0.PMID: 24687234
- Mitoma H, H. T. (Enero de 2018). Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents - Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine*. . 56-63. doi:doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.014. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27567553.
- Moreno, M. (2019). Evaluation of 12 GWAS-drawn SNPs as biomarkers of rheumatoid arthritis response to TNF inhibitors. A potential SNP association with response to etanercept. *Plos One*.
- Noack M, M. P. (Junio de 2017). Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. . 39, 4, 365-383. doi:10.1007/s00281-017-0619-z
- Nuez, F. y. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Ortea, I. R. (2016). Biomarcadores de proteínas séricas candidatas independientes de la respuesta al adalimumab y al infliximab en la artritis reumatoide: un estudio exploratorio. *Plos One*. 11, 4.
- Oscar Arturo Prior-González, E. G.-G.-L.-G.-P. (2011). *Farmacogenetic and its clinical importance: to a safe and efficient therapy* (Vol. 13. Núm. 50). Medicina Universitaria.
- Pallai, A. K. (2016). Transmembrane TNF- α reverse signaling inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine formation in macrophages by inducing TGF- β : therapeutic implications. *The Journal of Immunology*.
- PJW Venables, M. M. (s.f.). Clinical manifestations of rheumatoid arthritis. Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Recuperado el 20 de Octubre de 2020

- Puentes Osorio Yolima, A. P. (Marzo de 2018). Pharmacogenomics of etanercept, infliximab, adalimumab and methotrexate in rheumatoid arthritis. *25*, 22-37.
- Puentes-Osorio Y, A. P.-C. (31 de Mayo de 2021). Potential clinical biomarkers in rheumatoid arthritis with an omic approach. *Auto Immun Highlights*. doi: 10.1186/s13317-021-00152-6. PMID: 34059137; PMCID: PMC8165788.
- Rae., D. L. (s.f.). *Pharmacogenetics of Cancer Drugs. I*Department of Clinical, Social, and Administrative Sciences, University of Michigan College of Pharmacy, Ann Arbor, Michigan *Annual Review of Medicine* (Vols. Vol. 66: 65-81 (Volume publication date January 2015) First published online as a Review in Advance on October 29, 2014.). doi:10.1146/annurev-med-053013-053944
- Reddy, S. M. (2016). Real-world effectiveness of anti-TNF switching in psoriatic arthritis: a systematic review of the literature. *Clinical rheumatology*. (35(12), 2955-2966).
- Restrepo, L. G. (2016). Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. *23*(2), 102-114. ScienceDirect.
- Reyes, B. &. (2017). Anti-drug antibodies in Colombian patients with rheumatoid arthritis treated with Enbrel vs Etanar – Preliminary report. 103-108. *Journal of Immunotoxicology*.
- Ritter, J. F. (2020). *Farmacología*. Barcelona: Barcelona: GEA Consultoría Editorial, S.L.
- Roghianian, A. &. (s.f.). © *The copyright for this work resides with the BSI*. Recuperado el 26 de Octubre de 2020, de <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%3%A9lulas#:~:text=Las%20c%3%A9lulas%20B%20son%20e%20dirigidas%20frente%20a%20invasores%20pat%3%B3genos>.
- Romero, P. T. (2018). A FCGR3A Polymorphism Predicts Anti-drug Antibodies in Chronic Inflammatory Bowel Disease Patients Treated With Anti-TNF. 10-15. *International Journal of Medical Sciences*.
- Rubbert-Roth A, S. M.-P. (18 de Diciembre de 2019). Failure of anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis: The pros and cons of the early use of alternative biological agents. *Autoimmun Rev*. .
- Salomón, D. G. (2006). Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Extended Report*. 1608-1612.
- Scherer HU, H. T. (Junio de 2020). The etiology of rheumatoid arthritis. *JAutoimmun*. doi:doi: 10.1016/j.jaut.2019.102400
- Schoeman, C. G. (2018). Remodelación del proteoma de HDL con respuesta al tratamiento con abatacept o adalimumab en el ensayo AMPLE de pacientes con artritis reumatoide. *Ensayo clínico: Aterosclerosis*. 107-114.
- Serio, I. &. (2018). Rheumatoid arthritis: new monoclonal antibodies. . (54(3), 219.). Barcelona, Spain: *Drugs of today*.

- Smolen JS, A. D. (22 de Octubre de 2016). McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):2023-2038.. Epub 2016 May 3. Erratum in: *Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):1984. Mateos C. Artritis reumatoide (I). *Medicine*. 2013;11. doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
- Smolen, J. A. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 4. doi:10.1038/nrdp.2018.1.
- Smolen, J. A. (2018). *Rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18001. doi:10.1038/nrdp.2018.1.
- Smolen, J. S. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18001. doi:10.1038/nrdp.2018.1
- Solau-Gervais E, L. N. (2006). Lack of efficacy of a third tumour necrosis factor α antagonist after failure of a soluble receptor and a monoclonal antibody. *Rheumatology* .
- South ST, L. C. (2013). Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee, et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. *15*, 901-909. *Genet Med*.
- St Clair EW, V. d. (s.f.). *Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial*. *Arthritis Rheum*. doi:2004;50:3432–43
- Strand, V. B.-S.-F. (2017). Inmunogenicidad de los productos biológicos en las enfermedades inflamatorias crónicas: una revisión sistemática. 299-316. *Biofármacos*.
- Talotta, R. B.-P. (2015). Paradoxical expansion of Th1 and Th17 lymphocytes in rheumatoid arthritis following infliximab treatment: a possible explanation for a lack of clinical response. *35*(6), 550-557. *Journal of clinical immunology*.
- Tanaka E1, T. A. (2004). *Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs*. *Best Pract Res ClinRheumatol*.
- Udalova I, M. C. (Agosto de 2016). Anti-TNF Therapy. *Microbiol Spectr*. . 4. doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015. PMID: 27726761.
- Uribe Liliana, A. M. (2010). Guía de Actuación Farmacéutica en pacientes con Artritis Reumatoide. 24-27. *Medicarte S.A*.
- Van de Putte LBA, A. C. (2004). Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum* . (63:508-16.).
- Venter., S. B. (s.f.). *Sequencing the Entire Genomes of Free-Living Organisms: The Foundation of Pharmacology in the New Millennium*. (Vols. Vol. 40: 97-132). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.97
- Volkov, M. S. (2019). Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunological Reviews*. doi:10.1111/imr.12829

- Wijnen P., O. d. (2007). et al: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther.* 26, 211-219.
- Yan L, H. R. (15 de Noviembre de 2015). Establishment of a cell model for screening antibody drugs against rheumatoid arthritis with ADCC and CDC.
- Yolima Puentes Osorio, P. A. (2018). . Pharmacogenomics of etanercept, infliximab, adalimumab and methotrexate in rheumatoid arthritis. Structured review *Colombian Journal of Rheumatology.* 25, 22-37.
- Zhang, K. X. (2020). Opinión actual en farmacología. Elsevier,. 54, 59-71.

Anexo 1: Aprobación Comité de Ética



Medellín, 20 de enero de 2017

Doctora
YOLIMA PUENTES OSORIO
Investigadora
Hospital Pablo Tobón Uribe
Medellín

Ref: "Farmacogenómica en pacientes colombianos con artritis reumatoide"
Protocolo: 2016.088

Estimado Doctor:

Por la presente informamos que con fecha 19/0/2016 y según consta en el acta 01/2017, el Comité de Investigaciones y Ética en Investigaciones del Hospital aprobó la investigación en mención.

Al finalizar el estudio debe dejar informe escrito de la investigación en el Hospital y en caso de presentaciones o publicaciones, deben dar los créditos al Hospital.

Igualmente debe diligenciar, firmar y devolver el acta de compromiso antes de comenzar la investigación, la cual se anexa.

Si en un año no han terminado la investigación, deben someter un informe de avance al Comité.

Atentamente,

JAIME ALBERTO LÓPEZ MONSALVE
Presidente del Comité de Investigaciones y Ética en Investigaciones
Calle 78B # 69-240 – teléfono 4 445 92 88 - Fax 4 445 97 58



Anexo 2 Pasantía Internacional

Sevilla, 3 de Abril de 2019

Señores:
COLFUTURO
Bogotá

Asunto: CARTA DE INVITACIÓN PASANTÍA ESPAÑA

Respetados señores:

MIGUEL ANGEL CALLEJA, Farmacéutico de Hospital en Junta de Andalucía, en calidad de cotutor de la estudiante de VII Semestre del Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias YOLIMA PUENTES OSORIO C.C. 43.261.632, en el marco del proyecto de investigación Farmacogenómica en la Artritis Reumatoide, invita a la estudiante, al Hospital Universitario Virgen de la Macarena de la ciudad de Sevilla, España. Las fechas de estancia son de marzo 15 de 2019 a Julio 15 de 2019 y la persona encargada del acompañamiento en España es el farmacéutico Coordinador del laboratorio de Farmacotecnia del Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Vicente Merino Bohórquez, su correo de contacto es: vicente.merino.sspa@juntadeandalucia.es.

Agradezco su atención y colaboración,



Miguel Ángel Calleja Hernández
Co-Tutor España

Anexo 3 Consentimiento Informado

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN FARMACOGENÓMICA EN PACIENTES COLOMBIANOS CON ARTRITIS REUMATOIDE

Fecha: _____ Nombre del paciente: _____ Cédula: _____

Muestra: Sangre Otros _____

Deo consentimiento a la sección de Biología Molecular del HOSPITAL PABLO TOBÓN URIBE para utilizar estas muestras para el proceso de investigación farmacogenómica en pacientes colombianos con artritis reumatoide, en el propio hospital y/o centros involucrados con la investigación, siempre de acuerdo con las normas éticas vigentes.

Declaro que he recibido respuesta a todas mis preguntas y se me ha aclarado toda la información relacionada con la investigación, la toma de muestra, los procedimientos, riesgos, molestias y beneficios que pueden obtenerse. Igualmente, manifiesto que se me ha explicado la justificación y objetivos de la investigación. Lo anterior, de acuerdo con la información que se presenta a continuación:

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La farmacogenómica de la población Colombia con Artritis Reumatoide (AR), entendida como la respuesta individual a medicamentos en función del genoma de cada paciente, puede ser una explicación a los problemas de efectividad y seguridad que se presentan durante el tratamiento farmacoterapéutico de la AR. En la actualidad, existen estudios limitados sobre la farmacogenómica de la población Colombiana; por ello, es necesario identificar y clasificar los polimorfismos genéticos propios de pacientes colombianos con AR, que influyen en la respuesta metotrexato, infliximab, etanercept, adalimumab y, con ello contribuir a la medicina de precisión, es decir, la prescripción médica acorde con la especificidad del genoma de cada paciente. Con el presente proyecto se busca determinar la asociación de polimorfismos genéticos con la respuesta a medicamentos inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y metotrexato. Para ello, se realizará un estudio prospectivo de casos y controles en pacientes con tratamiento farmacoterapéutico de metotrexato, infliximab, etanercept, adalimumab, en monoterapia o terapia combinada. Como resultado se espera contribuir con la realización de test genéticos específicos para la AR y la generación de una base farmacogenómica de la población colombiana con AR.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Identificar polimorfismos genéticos característicos de pacientes colombianos con artritis reumatoide y asociarlos con la respuesta a metotrexato e inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α): infliximab, etanercept, adalimumab.
- Generar una base farmacogenómica de los polimorfismos genéticos de la población colombiana con artritis reumatoide, con los datos obtenidos al realizar la secuenciación de próxima generación (NGS).
- Valorar otras causas de variabilidad en la respuesta de metotrexato e inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

RIESGOS

La investigación tiene riesgo mínimo, acorde con el Artículo 10 de la Resolución 008430/93, ya que el estudio se hace en la identificación de características o está en oferta a los participantes, no se involucran en mediciones

MOLESTIAS

Al participar en esta investigación es posible que experimente molestias como pincharle las venas.

BENEFICIOS QUE PUEDEN OBTENERSE

Puede que no se obtengan beneficios directos para el paciente, pero es probable que su participación ayude a identificar polimorfismos genéticos característicos de pacientes colombianos con artritis reumatoide y asociarlos con la respuesta a metotrexato e inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α): infliximab, etanercept, adalimumab.

OBSERVACIONES ADICIONALES

- Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aún cuando haya aceptado antes.
- Usted no tiene porque tomar parte en esta investigación si no desea hacerlo. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que quiera. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.
- Estamos invitando a los pacientes con AR tratados con metotrexato, infliximab, etanercept, adalimumab en monoterapia o terapia combinada; mayores de 18 años
- Los datos personales que se le solicitan tienen como finalidad mantener actualizada las bases de datos de la investigación, las cuales se utilizan para realizar seguimiento y garantizan que no se presente ningún tipo de perjuicio o discriminación.

Para dar cumplimiento a obligaciones contraídas con nuestros pacientes les informamos que de conformidad con lo dispuesto en la ley 1581 de 2012 los datos de carácter personal que se obtengan de su atención serán recopilados en una base de datos y según nuestras políticas de tratamiento de datos personales, los mecanismos a través de los cuales hacemos uso de éstos son seguros y confidenciales, pues contamos con los medios tecnológicos idóneos para asegurar que sean almacenados de manera tal que se impida el acceso indeseado por parte de terceras personas, y en ese mismo orden aseguramos la confidencialidad de los mismos.

Finalmente, declaro que se me ha informado sobre la confidencialidad del estudio según las condiciones del secreto profesional y las leyes de protección de la intimidad vigentes.

Con la aceptación, autorizo el tratamiento de los datos con la finalidad mencionada y reconozco que los datos suministrados son ciertos y que no ha sido alterada ni omitida ninguna información.

Entiendo que prueba se va a realizar y me han resuelto todas las dudas antes de proceder a tomar el examen
 SI NO

La participación en esta prueba genética es completamente voluntaria SI NO

Aceptación de participación:

Al firmar este consentimiento informado Usted está dando acceso a sus registros y datos médicos personales,

Yo, _____ he leído la información descrita en este documento y entiendo que puedo hacer todas las preguntas que desee en lo relacionado a cualquier tema del estudio.

Yo entiendo que mi participación es voluntaria, que puedo retirarme del estudio libremente sin tener que dar ninguna explicación sobre mi decisión de hacerlo y que esto no afectará en ninguna forma los cuidados de salud que debo recibir, derivados de los procesos o sucesos de la investigación.

Yo doy mi libre consentimiento para ser incluido en esta investigación

Manifiesto que no he recibido presiones verbales, escritas y/o mímicas para participar en el estudio; que dicha decisión la tomo en pleno uso de mis facultades mentales, sin encontrarme bajo efectos de medicamentos, drogas o bebidas alcohólicas, consciente y libremente

AUTORIZACIÓN: Yo autorizo a los investigadores a incluirme en esta investigación sobre "Farmacogenómica en pacientes colombianos con artritis reumatoide" y a usar los resultados en forma legal.

A ser completado por el voluntario

Nombre: _____

Firma: _____

Número de CC: _____

Fecha: _____

Huella

A ser completado por el médico o el investigador que tome el consentimiento informado

Nombre: _____

Firma: _____

Número de CC: _____

Huella

Anexo 4: Identificación de pacientes por parte del reumatólogo

 UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA	PROYECTO: FARMACOGENÓMICA EN PACIENTES COLOMBIANOS CON ARTRITIS REUMATOIDE	FECHA			Código	
		DD	MM	AAAA		
FORMATO DE REMISIÓN DE PACIENTES						
IDENTIFICACIÓN DEL MD ESPECIALISTA						
Nombres y apellidos completos:						
DATOS BÁSICOS DEL PACIENTE						
Nombres y apellidos completos:						
N° Identificación:		Lugar de atención:				
N° Historia Clínica:	Hospital Pablo Tobón Uribe	Clinica Universitaria Pontificia Bolivariana	Artmedica			
Teléfono fijo:		Teléfono fijo acompañante:				
Teléfono móvil:		Teléfono móvil acompañante:				
Correo electrónico paciente o acompañante:						
Género: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>		Fecha de nacimiento:	DD	MM	AAAA	
Presenta Fallo Terapéutico: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Forma de identificar fallo terapéutico		Tratamiento farmacológico (varias respuestas)			
	Prueba		Valor	Adalimumab <input type="checkbox"/>		
	SDAI (principal) <input type="checkbox"/>			Etanercept <input type="checkbox"/>		
	DAS 28 <input type="checkbox"/>			Infliximab <input type="checkbox"/>		
	Otro?:Cual?_____			Metotrexato <input type="checkbox"/>		

Anexo 5 Evaluación de Adherencia

FORMATO DE EVALUACIÓN DE ADHERENCIA A LOS MEDICAMENTOS											
Datos básicos del paciente											
Nombre completo y apellidos:										Código	
N° Identificación:				N° historia clínica:				Edad:		Sexo F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	
Información del tratamiento											
Medicamentos prescritos											
Nombre medicamento	Vía de administración			Frecuencia de administración			Fecha de inicio de tratamiento			Pérdida o adelanto de dosis:	
										SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
							DD	MM	AAAA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
							DD	MM	AAAA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
							DD	MM	AAAA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Retrasos en la administración (últimos registros en kardex)	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
Presenta eventos adversos a medicamentos: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Si, la respuesta es sí: por favor especifique:							Exámenes Paraclínicos				
Aumento de enzimas hepáticas: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							Exámen			Resultado	
							Factor Reumatoide (FR)				
GI: Nauseas, vomito, estomatitis: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							Anticuerpos contra el péptido citrulinado (CCP)				
SNC: Cefalea, Confusión, Fatiga: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							Protina C reactiva (PCR)				
Reacciones tipo alérgico: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							Velocidad de sedimentación globular (VSG)				
Reacciones infusionales o sitio de inyección: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>							Exámenes de función hepática (AST – ALT)				
Infecciones: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>											
Otros? SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Cuales?: _____											
Entrevista al paciente											

Anexo 6 Material de apoyo sobre información del proyecto



Proyecto de investigación

FARMACOGENÓMICA EN PACIENTES COLOMBIANOS CON ARTRITIS REUMATOIDE

Estaríamos agradecidos por su participación en la presente investigación.

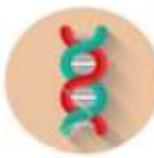
Nuestro objetivo es identificar variaciones en su ADN, que hacen que responda o no a sus medicamentos antiartrémicos.





¿Quiénes pueden participar?

Hombres y mujeres mayores de 18 años diagnosticados con artritis reumatoide, que asistan a cualquiera de las instituciones de salud donde se realiza el proyecto de investigación.



¿Cómo se llevará a cabo?

Mediante farmacogenómica, una disciplina que estudia la respuesta de los medicamentos determinada por la variabilidad genética y los diferentes factores ambientales.



Criterios de selección

Personas en tratamiento con Adalimumab, Etanercept, Infliximab y/o Metotrexato mayor a 3 meses, cuya enfermedad está controlada o aquellos en los que se presentó un fallo terapéutico.

Se cuenta con un consentimiento informado previo a la investigación, el cual usted puede firmar libremente.



Confidencialidad

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y en ningún momento afectará los servicios de salud que reciba. Los datos personales solicitados tienen como finalidad mantener actualizada la base de datos. Los investigadores garantizan un adecuado manejo de la información sin causar ningún tipo de perjuicio o discriminación.



Riesgos

Se procederá a una toma de muestra de sangre una vez explicado y firmado el consentimiento informado. La investigación no acarrea riesgos genéticos y los riesgos derivados de la toma de muestra suelen ser mínimos: dolor, moretones, inflamación de venas o infecciones en muy raras ocasiones.



Divulgación de la información

En caso de participar, tienes derecho de conocer los resultados de la investigación. Por lo cual, la investigadora principal se compromete a brindarte información apenas concluya la investigación.



Con tu aporte en este proyecto, estas contribuyendo a la generación de nueva información, para lograr que más pacientes con artritis reumatoide tengan mejores resultados en salud.



Yolima Puentes Osorio
Investigadora Principal
Química Farmacéutica
Universidad de Antioquia



artmedica



reumalab



EL HOSPITAL CON ALMA
Pablo Tobón Uribe

Anexo 7 Cuestionario de apoyo para evaluación adherencia

CUESTIONARIO DE CUMPLIMIENTO TERAPÉUTICO PARA REUMATOLOGÍA (CQR 19)	Puntaje
¿Si el reumatólogo me dice que tome los medicamentos, lo hago?	
¿Tomo mis medicamentos antirreumáticos porque tengo menos problemas?	
¿Definitivamente no me atrevo a perder mis medicamentos antirreumáticos?	
¿Si puedo ayudarme con terapias alternativas, prefiero eso a lo que mi reumatólogo prescribe?	
¿Mis medicinas siempre se guardan en el mismo lugar y por eso no las olvido?	
¿Tomo mis medicamentos porque tengo total confianza en mi reumatólogo?	
¿La razón más importante para tomar mis medicamentos antirreumáticos es que todavía puedo hacer lo que quiero hacer?	
¿No me gusta tomar medicina, si puedo no los consumo?	
¿Cuándo estoy de vacaciones, a veces sucede que no tomo mis medicamentos?	
¿Tomo mis medicamentos antirreumáticos, porque considero que es el objetivo de visitar al reumatólogo?	
¿No espero milagros de mis medicamentos antirreumáticos?	
¿Si no tolero los medicamentos, los dejo de consumir?	
¿Si no tomo mis medicamentos antirreumáticos con regularidad, la inflamación regresa?	
¿Si no tomo mis medicamentos antirreumáticos, mi cuerpo me advierte?	
¿Mi salud va por encima de todo y si tengo que tomar medicamentos para mantenerme bien, lo hago?	
¿Yo uso un organizador de dosis para mis medicamentos?	
¿Me aferro a lo que el doctor me dice?	
¿Si no tomo mis medicamentos antirreumáticos, tengo más complicaciones?	
¿Salgo el fin de semana y olvido tomar mis medicinas?	