

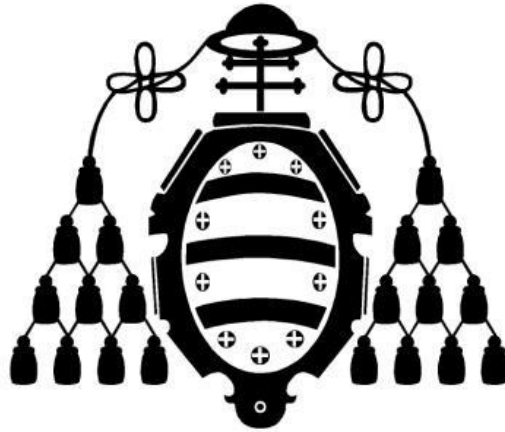
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR
ÁREA DE INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RESPUESTA A
CORTICOIDES EN PACIENTES DE ARTRITIS
REUMATOIDE. EFECTO SOBRE CITOCINAS Y CÉLULAS T
REGULADORAS**

BANESA DE PAZ CAZÓN
OVIEDO, 2016



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR
ÁREA DE INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RESPUESTA A
CORTICOIDES EN PACIENTES DE ARTRITIS
REUMATOIDE. EFECTO SOBRE CITOCINAS Y CÉLULAS T
REGULADORAS**

BANESA DE PAZ CAZÓN
OVIEDO, 2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: "Polimorfismos genéticos y respuesta a corticoides en pacientes de artritis reumatoide. Efecto sobre citocinas y células T reguladoras"	Inglés: "Genetic polymorphisms and corticoid response in patients with rheumatoid arthritis. Effect on cytokines and regulatory T cells"
2.- Autor	
Nombre: Banesa de Paz Cazón	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: Departamento de Biología Funcional	

RESUMEN (en español)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por una inflamación persistente de las articulaciones, que deriva en una destrucción progresiva, generando distintos grados de deformidad e incapacidad funcional. Caracterizada por un exceso de mediadores inflamatorios, están bien documentadas las alteraciones en los niveles de IL-10 y el TNF α , dos citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria. Dado que la producción de estas moléculas está genéticamente controlada, polimorfismos funcionales en sus promotores podrían afectar el desarrollo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Los resultados derivados de esta tesis doctoral muestran una asociación de los polimorfismos genéticos de estas citocinas con la susceptibilidad, aparición de autoanticuerpos, células T reguladoras (Treg) y respuesta al tratamiento. Así, los portadores del genotipo alto productor de IL-10 presentan un mayor riesgo de desarrollar AR, aunque estos pacientes tendrían una mejor respuesta al tratamiento con corticoides. Esta asociación se encontró significativamente incrementada cuando se combinaron los genotipos alto de IL-10 y bajo de TNF α . Sin embargo, en los pacientes portadores del genotipo bajo productor de IL-10/alto de TNF α existirían otros factores involucrados en el inicio y desarrollo de la enfermedad que podrían estar relacionados con la formación de anticuerpos anti-CCP, ya que su presencia al diagnóstico se encontró asociada con este genotipo.

El estudio de pacientes al diagnóstico mostró que, a pesar de que sus parámetros clínicos indicaban una alta actividad de la enfermedad, no existían muchas alteraciones en los niveles de citocinas ni de células Treg en comparación con pacientes con larga evolución de la enfermedad, haciéndose patente un incremento de la situación inflamatoria durante la progresión de la AR. Una excepción notable es el caso de la IL-6, cuyos niveles presentaban una estrecha correlación con la actividad clínica. Sin embargo, se pudo comprobar que aquellos pacientes con genotipo buen respondedor a corticoides (alto IL-10/bajo TNF α)



presentaban niveles elevados de FoxP3 y células Treg, y cantidades relativamente bajas de mediadores inflamatorios, cuando se compararon con el resto de genotipos.

La identificación de distintos subtipos de células T con funciones potencialmente reguladoras ha abierto un amplio camino a la investigación de su posible papel en el control de las patologías autoinmunes. Aunque se han descrito varios subtipos de células T CD4⁺ reguladoras, la expresión del factor de transcripción FoxP3 parece ser clave en su desarrollo y función. Nuestros estudios no mostraron diferencias en los niveles de células Treg clásicas (CD25^{high}FoxP3⁺) en pacientes de AR, pero revelaron una elevada proporción de células CD25-FoxP3⁺, que estaban negativamente asociadas con la actividad de la enfermedad y otros parámetros clínicos. Nuevamente, los pacientes tratados con corticoides portadores del genotipo buen respondedor a esta terapia eran los que presentaban mayores niveles de células CD25-FoxP3⁺ y linfocitos T productores de IL-10, y además, cantidades relativamente bajas de células productoras de los mediadores inflamatorios IL-17, IFN γ y TNF α , lo que podría explicar parte los efectos beneficiosos de los corticoides en este grupo de pacientes.

Todos estos resultados corroboran el uso de estos marcadores genéticos en IL-10 y TNF α como predictores de la respuesta al tratamiento con corticoides en pacientes de AR, y sugieren que al menos parte de sus efectos beneficiosos sobre la actividad de la enfermedad y otros parámetros clínicos pueden estar relacionados con la promoción de células reguladoras, la disminución de mediadores inflamatorios o la restauración del balance entre citocinas pro y antiinflamatorias.

RESUMEN (en Inglés)

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterised by chronic inflammation leading to chronic joint destruction and varying degrees of joint deformity and functional disability. RA is characterised by excessive inflammatory mediators amongst which alterations in levels of cytokines involved in the inflammatory response such as IL-10 and TNF α are well described. Given that production of these molecules is genetically regulated, it is possible that functional polymorphisms in the promoters of the genes encoding these cytokines could affect disease onset and response to treatment.

The findings presented in this thesis demonstrate an association between genetic polymorphisms in genes encoding for these cytokines and susceptibility to auto-antibody and regulatory T cell generation and treatment response. Thus, carriers of the high IL10 production genotype are at higher risk of developing RA but show better response to corticosteroid treatment. This observation was



significantly increased when the high IL10 and low TNF α genotypes were combined. In contrast in patients with low IL10 high TNF α genotype other factors involved in the initiation and development of disease were found that could be related to the production of anti-CCP antibodies given that this genotype was associated with anti-CCP antibody positivity at diagnosis.

The study of newly diagnosed patients revealed that despite clinical characteristics indicating high disease activity, no differences in cytokine or T reg levels were present when compared to patients with longstanding disease indicating increasing inflammatory response during progression to RA. IL6 was an exemption to this observation as its levels were correlated with disease activity. Nevertheless, the analysis of patients with good responder to corticosteroids treatment genotype (high IL10/low TNF) revealed high levels of FoxP3 and T regs and relatively lower levels of inflammatory mediators when compared to other genotypes.

The identification of different T cell subsets with potential regulatory functions has led to increasing interest in the study of their potential role in the regulation of autoimmune pathologies. Although various subsets of CD4⁺ regulatory T cells have been described, expression of the transcription factor FoxP3 appears key for their development and function. We did not find differences in levels of classical Treg cells (CD25^{high}FoxP3⁺) in RA patients but we found an increased proportion of CD25-FoxP3⁺ cells. The levels of these cells negatively correlated with disease activity and other clinical parameters. Again, corticosteroid treated patients with good responder genotype had higher levels of CD25-FoxP3⁺ cells and IL10 producing lymphocytes. These patients also had relatively lower levels of IL17, IFN and TNF producing cells which may explain, at least in part, their better response to corticosteroid treatment.

Our findings support the use of IL10 and TNF genotypes as predictors of corticosteroid treatment response in RA patients and suggest that, at least in part, their beneficial effect on disease activity and other clinical parameters may be related to regulatory T cell production, decreased production of pro-inflammatory mediators or restoration of the balance between pro and anti-inflammatory cytokines.

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 LA ARTRITIS REUMATOIDE	8
1.1.1 Epidemiología	8
1.1.2 Clínica y diagnóstico.....	9
1.1.3 Etiología	10
Factores de riesgo genético.....	11
1.1.4 Tratamientos.....	13
Mecanismo de acción de los corticoides	15
1.2 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DE LA AR.	18
1.2.1 Autoanticuerpos.....	18
1.2.2 Células T reguladoras.....	22
1.2.2.1 Células T reguladoras naturales.....	22
1.2.2.2 Células T reguladoras inducidas.....	25
1.2.2.3 Células T reguladoras en la artritis reumatoide	26
1.2.3 Citocinas	28
Alteraciones de citocinas en la Artritis Reumatoide.	29
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
3.1 Pacientes y controles	39
3.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica	40
3.3 Determinación de polimorfismos genéticos de IL-10 y TNF α	41
3.4 Cuantificación de citocinas.....	43
3.5 Análisis fenotípico y cuantificación de células Treg.....	44
3.6 Análisis de citocinas intracelulares.....	45
3.7 Análisis de la expresión génica.	46
3.8 Análisis estadísticos	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Efecto del genotipo de la IL-10 y el TNF α sobre la susceptibilidad y la respuesta al tratamiento en pacientes de AR.....	50
4.2. Niveles de citocinas y células T reguladoras en AR y su asociación con la respuesta a los corticoides.....	60
4.3. Efecto del tratamiento sobre la expresión de Foxp3 y las células productoras de citocinas.	70
5. DISCUSIÓN.....	81
5.1. Efecto de los polimorfismos de IL-10 y TNF α en la susceptibilidad y desarrollo de anticuerpos.....	82

5.2. Influencia del genotipo en la evolución y respuesta al tratamiento	85
5.2.1. Balance de citocinas	86
5.2.2 Expresión de Foxp3 y células T reguladoras	88
6. CONCLUSIONES	92
7. BIBLIOGRAFÍA.....	95
8. ANEXO.....	117

ABREVIATURAS

ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados

ACR: *American College of Rheumatology* (Colegio Americano de Reumatología)

ADN: ácido desoxirribonucleico

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ANOVA: análisis de la varianza

Anti-CARP: *anti-carbamylated protein antibodies* (anticuerpos anti proteína carbamilada)

Anti-CCP: *anti-cyclic citrullinated peptide antibody* (anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados)

Anti-hnRNPA2: *anti-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2* (ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2)

AP: *activator Protein* (proteína activadora)

AR: Artritis Reumatoide

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Bcl: *B-cell lymphoma* (proteína de linfoma de células B)

CD: *cluster of differentiation* (clúster de diferenciación)

CSIF: *cytokine synthesis inhibitory factor* (factor inhibidor de la síntesis de citocinas)

CTLA: *cytotoxic T lymphocyte antigen* (antígeno del linfocito T citotóxico)

DAS: *disease activity score* (índice de actividad de la enfermedad)

DMSO: dimetilsulfóxido

EC: epítipo compartido

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiaminotetraacético)

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EULAR: *european league against rheumatism* (liga europea contra las enfermedades reumáticas)

EVA: escala visual analógica

FARME: fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad

Fc: fracción constante

FCS: *fetal calf serum* (suero bovino fetal)

FITC: *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FoxP3: *forkhead box protein 3*

FR: factor reumatoide

GC: glucocorticoides

GITR: *glucocorticoid-induced TNF-related protein* (proteína relacionada con el TNF inducida por glucocorticoides)

GM-CSF: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)

GR: glucocorticoid receptor (receptor de glucocorticoides)

GRE: *glucocorticoid responding element* (elemento de respuesta a glucocorticoides)

GWAS: genome-wide association study (estudio de asociación del genoma completo)

HLA: *human leukocyte antigens* (antígenos leucocitarios humanos)

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

IDO: indoleamina 2,3- dioxigenasa

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IPEX: *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome* (síndrome de disregulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al cromosoma X)

iTreg: *induced regulatory T cells* (células T reguladoras inducidas)

LAG: *lymphocyte-activation* (gen de activación de linfocitos)

LPS: lipopolisacáridos

LT: linfotóxina

MACS: *magnetic-activated cell sorting* (separación celular por activación magnética)

MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (proteínas quinasas activadas por mitógenos)

MHC: *major histocompatibility complex* (complejo principal de histocompatibilidad)

MMPs: *matrix metalloproteinases* (metaloproteinasas de matriz)

MNC: *mononuclear cells* (células mononucleares)

MPC: *mitochondrial pyruvate carrier* (portador mitocondrial del piruvato)

NFAT: *nuclear factor of activated T cells* (factor nuclear de células T activadas)

NFκB: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (factor nuclear kappa B factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

NK: *natural killer cells* (células "asesinas" naturales)

Nrp1: *neuropilin-1*

nTreg: *natural regulatory T cells* (células T reguladoras naturales)

PAD: peptidil arginina deaminasa

PAF: *platelet-activating factor* (factor activador de plaquetas)

PBS: *phosphate buffered saline* (solución salina tamponada con fosfato)

PCR: proteína C reactiva / polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PE: *phycoerythrin* (ficoeritrina)

PerCP: *peridinin chlorophyll protein* (proteína peridin clorofila)

PHA: *phytohemagglutinin* (fitohemaglutinina)

PKC θ : proteína quinasa C theta

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate* (forbol-12-miristato-13-acetato)

PTPN22: *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* (gen que codifica para la proteína tirosina fosfatasa tipo 22 (LYP))

RANKL: *receptor activator of NF- κ B ligand* (receptor activador del factor nuclear kappa B)

RANTES: *regulated on activation normal T expressed and secreted* (regulador expresado y secretado de la activación de linfocitos T normales)

ROR γ T: *RAR-related orphan receptor gamma t*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute médium*

SDF: *stromal cell-derived factor* (factor derivado de células del estroma)

SENS: *simple erosion narrowing score*

SER: Sociedad Española de Reumatología

SNPs: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismos de un solo nucleótido)

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

STAT: *signal transducers and activators of transcription* (transductores de señal y activadores de la transcripción)

TBS: *tris-buffered saline* (solución tampón tris)

TCR: *T cell receptor* (receptor de células T)

TGF: *transforming growth factor* (factor de crecimiento transformante)

Th: *T helper cells* (células T cooperadoras)

TNF: *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

Tr1: *regulatory T cells type 1* (células T reguladoras tipo 1)

TRAF1/C5: *tumor necrosis factor-receptor associated factor 1/complement component 5*

Treg: *regulatory T cells* (células T reguladoras)

VCAM: *vascular cell adhesion molecule* (molécula de adhesión vascular)

VSG: velocidad de sedimentación globular

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ARTRITIS REUMATOIDE

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, de carácter sistémico, consecuencia de complejas alteraciones autoinmunes, celulares y humorales, que son las responsables de iniciar y perpetuar el proceso inflamatorio. Se caracteriza por la aparición de un tejido sinovial de carácter invasivo conocido como “pannus” que junto a la liberación de gran variedad de factores inflamatorios conduce a la destrucción del cartílago y del hueso y en último término a la discapacidad del paciente.

1.1.1 Epidemiología

La AR es la artritis inflamatoria más común y la más frecuente de las enfermedades crónicas autoinmunes sistémicas. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, en una proporción 3:1. Aunque puede aparecer a cualquier edad, lo más habitual es que se presente entre los 40 y los 70 años.

Esta patología puede encontrarse en cualquier región del mundo, afectando en la actualidad entre un 0,5 y 1% de la población mundial(1), sin embargo, su prevalencia varía según el país y el área geográfica. De esta manera, los países del sur de Europa tienen niveles medios de incidencia menores que los países del norte de Europa y de América. Los países en vías de desarrollo tienen una incidencia aún menor, siendo la prevalencia notablemente más baja en las zonas rurales de África. Por el contrario, es mucho más frecuente en ciertas tribus nativas americanas (1). En España cinco de cada mil adultos (0,5%) padecen AR, con una prevalencia de 0,8% en mujeres y un 0,2% en hombres (2). Según los datos periódicos que nos ofrece la Sociedad Española de Reumatología (SER), la población asturiana

afectada representaría cerca de 0.01% de la población española mayor de 20 años.

1.1.2 Clínica y diagnóstico

La artritis reumatoide es una enfermedad altamente heterogénea, con un rango de presentaciones clínicas muy amplio. Afecta fundamentalmente a grandes y pequeñas articulaciones de todo el cuerpo de manera simétrica y con menor frecuencia se presentan alteraciones extra-articulares que pueden afectar prácticamente a casi todo el organismo y que en ocasiones pueden llegar a ser muy graves. La enfermedad suele cursar con picos de actividad y remisión siendo su evolución muy poco predecible. Por ello, se requieren evaluaciones periódicas frecuentes que determinen la actividad y evolución, así como el grado de respuesta al tratamiento que permitan mantener un control óptimo de la enfermedad.

A efectos de normalización de los estudios epidemiológicos y ensayos clínicos, la *American College of Rheumatology* (ACR) desarrolló en 1958 los criterios para el diagnóstico de la AR que posteriormente fueron revisados en 1987. En 2010, la ACR y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) desarrollaron nuevos criterios para facilitar la identificación de los pacientes con AR de comienzo reciente (3) y con AR definida cuando se presenta sinovitis en al menos una articulación en ausencia de un diagnóstico que lo justifique y una puntuación de 6 (de un total de 10) en los cuatro dominios representados en la tabla 1.

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

Tabla1. Criterios de clasificación para la AR 2010. ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VN: valor normal; VSG: velocidad de sedimentación globular(3).

1.1.3 Etiología

De manera general, la defensa inmune está mediada por dos sistemas complementarios, inmunidad innata e inmunidad adaptativa, que interactúan para formar un eficiente sistema de protección frente a amenazas externas. Un error o fracaso en los mecanismos de reconocimiento o auto-tolerancia puede conducir al desarrollo de una enfermedad autoinmune y a daños en los tejidos asociados. En la Artritis Reumatoide, como en las demás enfermedades autoinmunes, existe una pérdida de tolerancia frente a lo propio. Los mecanismos mediante los que ocurre son desconocidos, sin embargo, se postula el carácter multifactorial de la enfermedad, que surgiría como resultado de la combinación de causas

genéticas, hormonales y factores ambientales que provocarían la alteración de la respuesta inmune (4). De hecho, se ha sugerido que los factores ambientales desencadenarían la aparición de la enfermedad en personas genéticamente predispuestas.

No se conocen con precisión los factores ambientales que pueden desencadenar la AR, sin embargo, se ha sugerido que el tabaco, polvo de sílice (5) aceites minerales, infecciones bacterianas (distintas especies de micoplasma, Mycobacterias, Campylobacter, Yersinia, Salmonella...), víricas (HTLV1, EBV, HSV, rubeola, Parvovirus B19..) y factores hormonales (6) podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Factores de riesgo genético.

Desde hace más de 30 años se sabe que existe un factor de susceptibilidad genética en la AR que contribuye en un 40-60% al desarrollo de la enfermedad (7;8). Los primeros estudios fueron llevados a cabo entre hermanos y familiares de primer grado, donde se observó un aumento significativo de la prevalencia de la enfermedad cuando se comparó con la descrita en la población general (9);(10). En este contexto, numerosos estudios han demostrado que la presencia de ciertos alelos HLA-DRB1 determinan la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Inicialmente se comprobó la asociación de la AR con el HLADRB1*04 y los alelos *0401, *0404, *0405 o *0408 y posteriormente con otros alelos HLADRB como *0101, *0102 o *010. Todos estos alelos codifican para una misma secuencia de aminoácidos (QKRAA, QRRAA, o RRRAA) localizada en las posiciones 70-74 de la tercera región hipervariable de la cadena beta de la molécula HLA, una región que es fundamental en el proceso de reconocimiento antigénico y conocida como epítipo compartido (EC) (11). Esta secuencia es idéntica a otra de la glucoproteína 110 del virus de Epstein-Barr y también de algunas proteínas de choque térmico de *Escherichia coli*, por lo que esta secuencia conferiría a la molécula que la posee la capacidad de presentar antígenos propios como extraños y

desencadenar la respuesta inmune que da inicio a la enfermedad (12). Sin embargo, estos genes explicarían no más de un tercio del componente genético de la AR (13;13;14) y no explicarían del todo el desarrollo de la enfermedad.

En estudios de asociación de genes candidato se han identificado muchos polimorfismos genéticos que también contribuyen al desarrollo de la AR, como PTPN22 que codifica la proteína tirosina fosfatasa (Lyp). Un polimorfismo en un único nucleótido en este gen resulta en la desregulación de la señalización en el TCR asociándose con un aumento del riesgo de una serie de enfermedades autoinmunes incluida la artritis reumatoide (15-17). Otros genes de susceptibilidad de AR descritos son el TRAF1/C5 y el STAT4 (18;19), factor de transcripción clave en la regulación de la respuesta inmune que interviene en la señalización de vías que promueven la diferenciación de linfocitos T CD4 a Th1 y Th17, los cuales están involucrados en la patogenia de la AR (20;21). Otros estudios han encontrado asociación con genes implicados en la expresión de moléculas de MHC-II (MHC2TA)(22), productos de genes involucrados en modificaciones post-transcripcionales de proteínas (PADI4) y expresión diferencial de genes de citocinas que podrían contribuir al desarrollo y la gravedad de la enfermedad (4).

La reciente disponibilidad de estudios de genoma completo (GWASs) ha permitido conocer numerosos locus de susceptibilidad para AR, cuya contribución a la variación genética constituiría en su conjunto cerca del 5%. (21). Sin embargo, y dado que parece clara la contribución poligénica en la enfermedad, se hace necesaria la búsqueda de nuevos genes candidatos que ayuden a explicar y complementen los estudios realizados a fin de entender la causa y desarrollo de esta patología.

1.1.4 Tratamientos

Debido a que la etiología de la AR no se conoce, no existe un tratamiento específico para ella y por lo tanto las metas terapéuticas están enfocadas a la remisión de los síntomas y el retorno hacia la funcionalidad completa. Se sabe que la AR es más activa en los primeros años de la enfermedad, y que es en este período cuando aparecen las principales lesiones articulares que más adelante evolucionarán hacia la destrucción y deformidad articular. Por todo ello, el diagnóstico y el tratamiento precoz son esenciales y el antiguo modelo piramidal y progresivo ha dado paso a un enfoque más agresivo, de tal manera que, actualmente, se tiende a la administración de fármacos muy potentes ya desde el inicio de la enfermedad (FARMEs biológicos incluso en AR precoz).

Los fármacos que se utilizan para tratar la AR se dividen en tres categorías: analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), fármacos antirreumáticos modificadores del curso de la enfermedad (FARMEs), tanto sintéticos como biológicos, y corticoesteroides.

Los AINES como naproxeno, aspirina, ibuprofeno, diclonfenaco y ketoprofeno, entre otros, se utilizan para controlar procesos inflamatorios leves-moderados, como el dolor de las articulaciones, pero no son capaces de disminuir la progresión de la enfermedad.

Los FARMEs sintéticos o biológicos son capaces de prevenir o al menos reducir el daño articular producido por la enfermedad, y de esa manera preservar al máximo la articulación y la función articular. Entre los FARMEs de síntesis destaca el Metrotrexato, que es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la AR y generalmente es administrado en combinación con FARMEs biológicos o corticoides, incrementando así la eficacia y disminuyendo el número de fracasos y reacciones adversas (23).

Otros fármacos frecuentemente administrados son: Leflunomida, antimaláricos como Cloroquina o Hidroxicloroquina y Sulfasalazina.

Los avances en la fisiopatología de la AR y en la biotecnología, han permitido el desarrollo de los FARMEs biológicos, terapias dirigidas contra citocinas proinflamatorias específicas, consideradas clave en el desarrollo de la enfermedad, y que globalmente se conocen como terapias biológicas. Entre ellas cabe destacar los fármacos bloqueantes del TNF α , anticuerpos monoclonales cuyo principal mecanismo de acción está encaminado a neutralizar los efectos de esta molécula, ya que es sin duda una de las citocinas proinflamatorias con mayor participación en el daño articular. Existen varios fármacos comercializados: Etanercept (Embrex), Infliximab (Remicade), Adalimumab (Humira), Certolizumab pegol (Cimzia) y Golimumab (Simponi). Otras moléculas dirigidas contra citocinas o sus receptores son Anakinra (inhibidor de IL-1) o Tocilizumab (anti-IL6R).

Las terapias biológicas representan el tratamiento más efectivo actualmente disponible para pacientes con AR, pero debido a su elevado coste, diferencias en la respuesta clínica y a los potenciales riesgos de infecciones, neoplasias y aparición de otras enfermedades, se hace necesario el control de su uso en la práctica clínica, ya que no todos los pacientes pueden ser candidatos idóneos a ser tratados con estos fármacos.

Los glucocorticoides (GC) son los fármacos disponibles con mayor actividad antiinflamatoria y constituyen el fármaco de primera línea en el tratamiento del proceso inflamatorio impidiendo la liberación de sustancias que provocan los síntomas y signos de la inflamación (dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón) y el acceso al foco inflamatorio de nuevas células y mediadores que mantendrían y prolongarían el proceso inflamatorio. Debido a su relevancia en este trabajo, se describirá su mecanismo de acción.

Mecanismo de acción de los corticoides

Son moléculas lipofílicas, por lo que atraviesan con facilidad la membrana celular y se unen a su receptor citosólico (GR), que se expresa en casi todas las células humanas. Este receptor existe en dos isoformas, alfa y beta. El receptor alfa media los efectos hormonales clásicos, mientras que el beta es incapaz de unirse a la hormona y actúa como una forma antagónica del receptor alfa. En ausencia de GC, el receptor alfa (GR) se encuentra localizado en el citosol unido a un complejo de proteínas de choque térmico, inmunofilina y fosfoproteína. Este complejo presenta una estructura tridimensional formando tres dominios, uno para la unión del complejo de proteínas, otro para el ADN y el otro para el esteroide. Al producirse la unión con el GC se produce un cambio alostérico que se traduce en una disociación del complejo proteínico. Consecuentemente, el complejo GR-GC se trasloca dentro del núcleo y una vez allí, se une a genes de respuesta a GC a través de secuencias genéticas específicas denominadas elementos de respuesta a GC (GREs). Se inicia de este modo la estimulación o inhibición de la transcripción de genes blanco conocido como mecanismo de acción genómico.

El principal efecto antiinflamatorio de los GC se basa en la inhibición de la transcripción de numerosos genes que codifican proteínas proinflamatorias, entre los que se incluyen citocinas (IL-1, 2, 3, 4, 6, 11 y 13, TNF α y GM-CSF), quimiocinas (IL-8, RANTES, proteínas quimiotácticas de monocitos), moléculas de adhesión y enzimas reguladoras de la síntesis de otros mediadores (ciclooxigenasa, óxido nítrico sintetasa) (24;25). Además, desarrollan un efecto inhibitorio sobre la inflamación incrementando la síntesis de citocinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el TGF β (26;27), o de otras moléculas como los antagonistas de los receptores de la IL-1 y la IL-6 (27;28). En este sentido, varios estudios han puesto de manifiesto el incremento en los niveles de IL-10 después de la administración de esteroides (29;30). Por otra parte, inhiben la síntesis de proteínas que reducen la vida media del ARN mensajero mediante una mayor transcripción de ribonucleasas específicas (31;32).

El complejo GR-GC también es capaz de actuar regulando genes por mecanismos de transrepresión, como la inhibición directa de factores de transcripción proinflamatorios, factor nuclear kappa B (NF- κ B) y proteína activadora 1 (AP1). Además reduce la estabilidad de enzimas relacionadas con la expresión génica y proliferación celular (MAPK), y participa en el reclutamiento y actividad de enzimas responsables de la configuración de la cromatina. (31;33;34).

El amplio espectro de acciones de los esteroides no puede ser explicado solo por los efectos nucleares y por esto se plantea la hipótesis de los efectos no genómicos de estas sustancias. En esta categoría se incluirían los efectos que se producen a nivel de la membrana citoplasmática, canales iónicos y alteración de las propiedades de las proteínas asociadas, que derivarían en cambios en la permeabilidad de las células y cuyas consecuencias constituirían una posible explicación para los efectos observados con altas dosis de GC en el tratamiento de las crisis inflamatorias de distintas patologías inmunológicas.

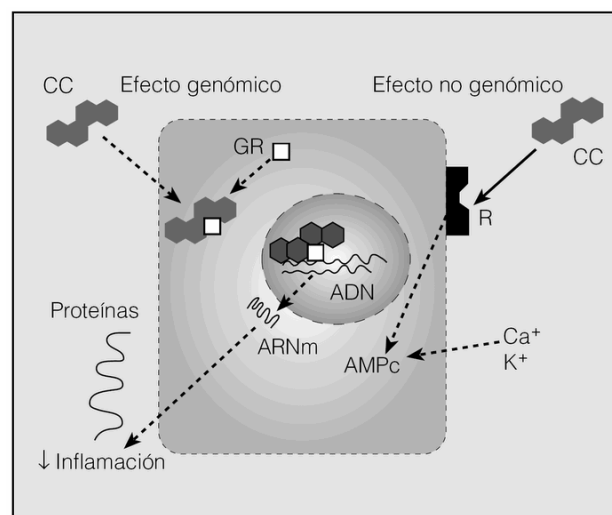


Figura 1. Esquema de los mecanismos de acción genómicos y no genómicos de los corticoides. (Modificado de Rodrigo GJ. Arch Bronconeumol 2006)

Los GC tienen importantes efectos en la respuesta celular, disminuyendo la supervivencia de eosinófilos o reduciendo el número y los efectos de células dendríticas presentadoras de antígenos, linfocitos o basófilos. También ejercen sus funciones actuando sobre otros tipos celulares regulando la permeabilidad en células endoteliales o inhibiendo la secreción mucosa en epitelios y células glandulares.

Por otra parte, estudios realizados en ratones y humanos sugieren que los corticoides pueden ejercer parte de sus acciones anti-inflamatorias e inmunosupresoras mediante la generación o expansión de células T reguladoras. En este contexto, se ha observado que pacientes con distintas enfermedades autoinmunes tratados con corticoides presentan un porcentaje de células T CD4⁺CD25^{high} y una expresión de FoxP3 significativamente mayor que aquellos que no recibían este tratamiento(35-37).

En la actualidad se ha demostrado que el uso de corticosteroides, a dosis bajas, es efectivo para la disminución de sintomatología dolorosa, la progresión radiográfica y de erosiones (38) reduciendo los niveles de citocinas clave en esta patología como son TNF α , IL-6 e IL-1 β (39-41). Se ha visto, sin embargo, que aproximadamente un 30% de los pacientes con AR no muestran una respuesta adecuada a esta terapia. Esta resistencia o falta de respuesta no parece estar relacionada con la gravedad u otros parámetros clínicos de la enfermedad, pudiéndose encontrar también en individuos normales, lo que apunta a una propiedad intrínseca del individuo y que, por lo tanto, podría tener una base genética (42). De hecho, se han identificado varios polimorfismos en el gen del GR que estaban asociados con diferencias en la sensibilidad a GC en pacientes de artritis reumatoide (43).

1.2 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS DE LA AR.

En la AR el proceso fisiopatológico está constituido por una red en la que interactúan múltiples factores. La activación de linfocitos T CD4+ autorreactivos tras el reconocimiento del autoantígeno desencadenaría un proceso inflamatorio, dando lugar a una producción alterada de autoanticuerpos, citocinas y otros mediadores en estos pacientes. La producción de anticuerpos seguida de la formación de inmunocomplejos y su depósito en los tejidos generaría una respuesta inflamatoria que conduciría al daño tisular. Este proceso asociado a la pérdida de tolerancia se debe, en parte, al papel que ejercen las células T reguladoras. Estas células son importantes en la resolución de la inflamación, el control de los mecanismos efectores y la minimización del daño en tejidos y órganos. Sin embargo, alteraciones en el número o la actividad de las Treg pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad autoinmune. Asimismo, cabe destacar la importancia de las citocinas como importantes reguladores y efectores en la respuesta inflamatoria. De manera que el desbalance entre la producción de citocinas proinflamatorias e inmunoreguladoras puede favorecer el desarrollo de esta patología.

1.2.1 Autoanticuerpos

La AR está asociada con ciertos autoanticuerpos, no exclusivos de esta patología pero lo suficientemente específicos como para servir de marcadores diagnósticos y pronósticos de la enfermedad.

El Factor Reumatoide (FR) es una inmunoglobulina predominantemente del tipo IgM aunque también existen otros isotipos como IgG o IgA. Es producido contra distintos epítomos de la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgG. Con una sensibilidad próxima al 66% y una baja especificidad (87%)(44), era hasta hace poco tiempo, la única prueba inmunológica usada para el estudio de la AR.

Aunque la mayoría de los pacientes presentan concentraciones elevadas de FR en sangre, no constituye un marcador específico de la enfermedad y puede encontrarse elevado en otras enfermedades autoinmunes, neoplasias, infecciones crónicas o incluso en personas sanas. Además del histórico valor diagnóstico, también tiene valor pronóstico asociándose con la gravedad de la enfermedad, progresión radiológica, destrucción articular y discapacidad funcional (45-47).

Los anticuerpos anti-Péptido Cíclico Citrulinado (anti-CCP) son un conjunto de anticuerpos cuyo blanco antigénico son los residuos de citrulina presentes en las proteínas. Los anti-CCP reconocen proteínas o péptidos en los que se desamina el aminoácido arginina en citrulina a través de un proceso de modificación post-traducciona. Como los residuos de arginina a menudo juegan un papel central en la integridad estructural de las proteínas, la conversión en citrulina puede resultar en una alteración de la estructura tridimensional y función alterada de éstas. La citrulinación está mediada por el enzima peptidil arginina deaminasa (PAD). Los enzimas PAD están normalmente presentes en las células y pueden ser activados, entre otros mecanismos, por un incremento en los niveles de calcio cuando las células sufren apoptosis como ocurre durante el proceso inflamatorio (48). Los anti-CCP pueden reconocer varias proteínas como la vimentina citrulinada, el colágeno, la enolasa y el fibrinógeno. Las cuatro proteínas son expresadas en la articulación y existen evidencias que sustentan que los anticuerpos contra el fibrinógeno y el colágeno tipo II citrulinados median la inflamación articular a través de la formación de inmunocomplejos (49).

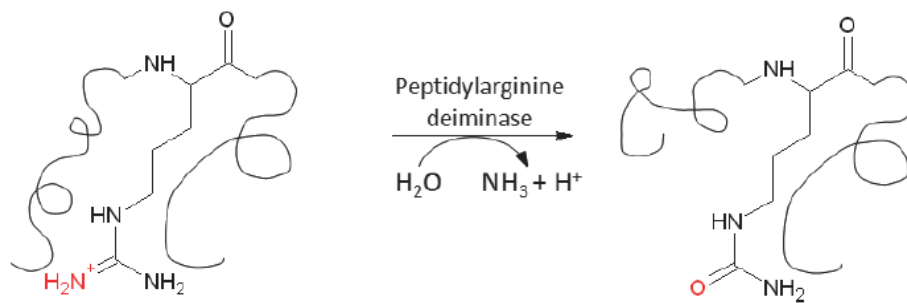


Figura 2: Conversión de peptidilarginina en peptidilcitrulina. Esta reacción es catalizada por la familia de enzimas peptidil arginina deaminasa (PAD). La carga positiva del grupo arginina guanidino se convierte en el grupo neutro citrulina ureido en presencia de agua produciendo amoníaco y un ion hidrógeno como subproductos. La pérdida de una carga positiva por el residuo de citrulina puede alterar la estructura de la proteína (50).

Los anticuerpos anti-CCP son los más específicamente relacionados con la AR, con una sensibilidad aproximada del 80% y una especificidad cercana al 98% (51;52). La alta especificidad y su baja prevalencia en la población sana les confieren una mayor capacidad de discriminación, comparados con el FR, en el diagnóstico diferencial de la AR respecto a otras enfermedades inflamatorias o reumatológicas.

Diversos estudios han demostrado un enriquecimiento de anticuerpos anti-CCP y proteínas citrulinadas en líquido y membrana sinovial de pacientes con AR (53;54) asociados con una enfermedad más activa y severa (55-57). Además, se pueden detectar varios años antes de la aparición clínica de la enfermedad (58) y su presencia constituye un buen indicativo para predecir su evolución (59;60).

Crecientes evidencias sugieren que la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CCP permitirían discriminar entre distintos fenotipos de AR, ya que representarían patologías con distintas entidades basadas principalmente en las diferencias encontradas en factores de riesgo genético y ambiental entre estos dos grupos. De hecho, se ha determinado una fuerte asociación entre estos anticuerpos y el complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC) (61). Así, se han descrito asociaciones genéticas con el HLA-DRB1 y PTPN22 que se limitan al subconjunto de anti-CCP-positivo, mientras que otros genes como el HLA-DRB1 * 03 se asocian únicamente con los anti-CCP-negativo (62-64). También son evidentes diferencias histológicas en la membrana sinovial, siendo los pacientes con anti-CCP-positivo los que se caracterizan por un infiltrado linfocitario más denso, a diferencia de una fibrosis más extensa en aquellos que presentan anti-CCP negativo (65). Aunque las características clínicas de ambos grupos no parecen ser significativamente distintas, el curso de la enfermedad se desarrolla de manera diferente, siendo los pacientes anti-CCP-positivos los que presentan una evolución más grave, caracterizada por mayor daño radiológico y una mayor actividad de la enfermedad (66-69). Por otra parte, se ha identificado un polimorfismo en el gen de la PAD tipo 4 que se caracteriza por la generación de un RNA mensajero de gran estabilidad que da origen a una PAD4 de mayor vida media, capaz por tanto de producir grandes cantidades de proteínas citrulinadas que en pacientes con factores de riesgo (presencia de EC) podría facilitar la síntesis de anti-CCP y de esta forma, hipotéticamente, iniciar el desarrollo de la enfermedad. Por todo ello, los anticuerpos anti-CCP se postulan como un factor clave en la autoinmunidad de la AR, siendo su detección utilizada como un factor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Recientemente se ha descrito otro sistema de autoanticuerpos dirigido contra un determinante estructuralmente similar (homocitrulina) al de los anti-CCP y que reconoce proteínas carbamiladas. Son los denominados anticuerpos anti proteínas carbamiladas (anti-CARP), presentes en aproximadamente el 50% de los pacientes con AR. Anticuerpos IgG e IgA anti-CARP fueron detectadas en un 16% y 30%, respectivamente, de los pacientes de AR negativos para anti-CCP, y han sido descritos como predictores de un curso más grave de la enfermedad (70).

Otros anticuerpos destacados son: anticuerpos anti-RA33 (71), anticuerpos Anti-Sa (72), anticuerpos anti-calpastatina (73), anticuerpos

contra el colágeno tipo II (detectados en suero y tejido sinovial), anti-glucosa-6-fosfato isomerasa, anti-hnRNP A2, anticuerpos contra proteínas de choque térmico y anticuerpos anti-nucleares (74).

1.2.2 Células T reguladoras

El sistema inmune dispone de varios mecanismos de tolerancia mediante los cuales se controla o suprime la respuesta a antígenos propios, evitando así procesos autoinmunes. Uno de los mecanismos por los que se mantiene la tolerancia a lo propio es mediante la actuación de las células T reguladoras capaces de suprimir las respuestas inmunes (75).

Inicialmente denominadas células T supresoras, no fue hasta los trabajos realizados por el grupo de Sakaguchi (76) cuando se centró más en el estudio de la función reguladora de una subpoblación de linfocitos T CD4+. Estos estudios mostraron cómo la transferencia adoptiva de células T CD4+ CD25- a ratones atímicos desencadenaba una enfermedad autoinmune, mientras que la transferencia de células T CD4+CD25+ la revertía. En humanos, las células T reguladoras constituyen entre el 5-7% de los linfocitos T CD4+ (77).

De una forma general las células reguladoras pueden clasificarse, según su origen, en células reguladoras naturales (nTreg) y células reguladoras inducidas (iTreg).

1.2.2.1 Células T reguladoras naturales

Estos linfocitos se originan en el timo y tienen un repertorio de receptores (TCR) similar al de las células T convencionales enfocado al reconocimiento de autoantígenos. No se conocen con exactitud los mecanismos de desarrollo y maduración de las células nTreg, sin embargo se sabe que algunos timocitos podrían recibir una fuerte señal a través del TCR y de CD28, escapando de la selección negativa y diferenciándose

hacia células nTreg. Posteriormente estas células migrarían a la periferia para suprimir células T autorreactivas.

Caracterización fenotípica

Las células nTreg son linfocitos T CD4+ que expresan constitutivamente la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), pero apenas producen dicha citocina por lo que su supervivencia es dependiente de la IL-2 exógena (78). Además de la elevada expresión de CD25, se caracterizan por su baja expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-7 (CD127), a diferencia de otras células T CD4+ (77;79;80). También son positivas para los marcadores CTLA-4 y GITR y tienen una baja expresión del marcador de activación temprana CD69. Ninguno de estos marcadores, sin embargo, es distintivo único de las células Treg.

Otros marcadores descritos, pero una vez más no exclusivos de células Treg, son: LAG-3, Nrp1, CD39, CD72, CD134 (OX40) o CD62L.

El factor de transcripción FoxP3 ha sido definido por diversos autores como el gen maestro controlador del desarrollo y función de las células reguladoras y es considerado el principal marcador molecular, a la fecha, de esta subpoblación reguladora. FoxP3 fue descrito inicialmente en ratones “escurfi” que presentan mutaciones espontáneas en la pauta de lectura del gen FoxP3. En humanos existe un síndrome con características similares denominado síndrome IPEX (inmunodesregulación poliendocrinopatía y endocrinopatía ligada al X). Entre las funciones de FoxP3 caben destacar su capacidad para reprimir la expresión de multitud de genes, como los que codifican para citocinas (incluyendo IL-2, IL-4 o IFN γ), y para regular la transcripción de otros tantos asociándose con distintos factores de transcripción como NFAT, NF- κ B o ROR γ t (81). Además, puede actuar como activador de la transcripción de otros muchos genes, entre los que se encuentran aquellos asociados con la adquisición de la función y el fenotipo de las células nTreg como GITR, CTLA-4 y CD25, mientras que es capaz de reprimir la expresión de CD127.

Recientemente, ha crecido el interés por el estudio de otro factor de transcripción (Helios) expresado en células nTreg y no en iTreg. Helios se uniría al promotor de FoxP3 regulando su expresión y de este modo participando de forma activa en el desarrollo y función de las células nTreg (82;83).

Mecanismos de acción

Las células nTreg pueden ejercer sus funciones supresoras a través de varios mecanismos dependientes de contacto celular, no bien conocidos, que contribuyen a atenuar la respuesta inmune. Entre ellos destacan la liberación de factores citotóxicos, como Granzima A y B o Perforinas, a través de los cuales se puede inducir la apoptosis en células T efectoras, monocitos o linfocitos B (84;85), e incluso expresar ectoenzimas como CD39 y CD73 capaces de generar adenosina y suprimir la función de células T efectoras (86).

Las nTreg pueden realizar igualmente su acción supresora afectando a la maduración y función de las células dendríticas (87;88). Una de las moléculas que participaría en este mecanismo es CTLA-4 que se une a las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 expresadas por células presentadoras de antígeno, enviando una señal negativa que causaría la inhibición de la activación de células T. Además, esta señalización podría aumentar la expresión inducida del enzima indoleamina 2-3 dioxigenasa (IDO) favoreciendo la aparición de células iTregs CD4 + CD25 + FoxP3 + por la expansión o conversión de células T naïve CD4 + CD25 - FoxP3- (89;90).

1.2.2.2 Células T reguladoras inducidas

Tras el reconocimiento del antígeno, los linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ vírgenes que salieron del timo pueden diferenciarse en la periferia hacia al menos 3 poblaciones de células efectoras distintas (Th1, Th2 y Th17) o hacia diferentes tipos de células reguladoras inducidas, entre las que destacan las células Tr1, Th3 y las más conocidas iTreg FoxP3⁺.

Las células Tr1 se generan tras la estimulación antigénica en presencia de IL-10 y se caracterizan por producir grandes cantidades de esta citocina inmunosupresora, además de pequeñas cantidades de TGFβ, que son las responsables de su efecto supresor. A diferencia de las células nTregs que migran a los ganglios linfáticos, las células Tr1 migran hacia los sitios de inflamación (91;92), suprimen las respuestas de células T CD4⁺ en respuesta al antígeno, la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de células presentadoras de antígeno (93). Las células Th3 se producen mayoritariamente como consecuencia de la tolerancia generada frente a la administración oral de un antígeno y se caracterizan por producir TGFβ y pequeñas cantidades de IL-10, mediante las cuales ejercen sus funciones tanto in vivo como in vitro (94). Funcionalmente, las células Tr1 y Th3 se diferencian de las naturales por su mecanismo de acción, ya que mientras que las nTreg requieren contacto celular para ejercer su función, las Tr1 y Th3 inhiben la proliferación mediante la producción de mediadores solubles (IL-10 y TGFβ).

Las células iTreg FoxP3⁺ poseen características fenotípicas y funcionales similares a las nTreg, aunque la expresión de FoxP3 en estos linfocitos parece ser transitoria (95), así como su capacidad para suprimir la proliferación (96), para lo que también requieren contacto celular. Las células iTreg pueden ser generadas in vitro a partir de células T CD4⁺CD25⁻ bajo ciertas condiciones de estimulación, que incluyen el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (97-99), células dendríticas maduras

(100), antígenos específicos o incluso a partir de citocinas como TGF β , capaz de inducir la expresión de FoxP3 y promover la diferenciación hacia células Treg. Del mismo modo las células iTreg pueden ser generadas in vivo por mecanismos no muy bien conocidos hasta el momento y junto a las células nTreg constituyen un grupo de células con fenotipo Treg FoxP3+ de la periferia.

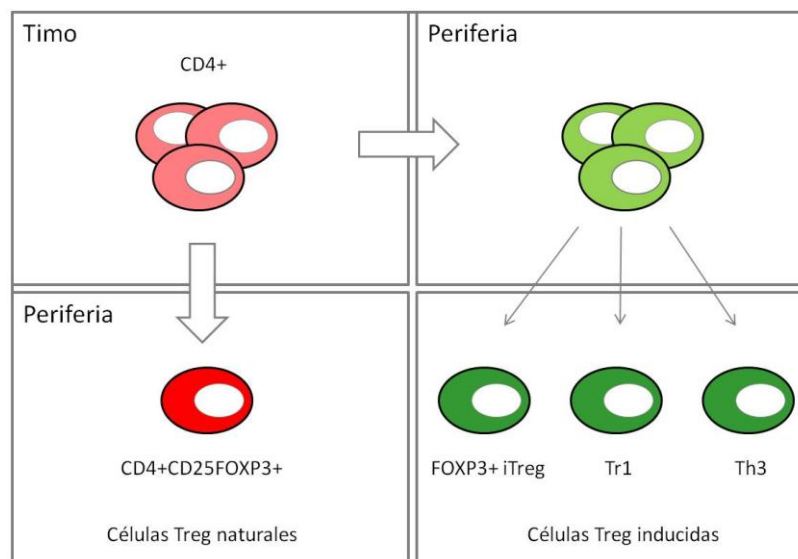


Figura 3. Representación esquemática de la distinción entre células T reguladoras naturales (nTreg) e inducidas (iTreg). Modificado de Laurenço EV. y La Cava A. (101).

1.2.2.3 Células T reguladoras en la artritis reumatoide

En la AR existen dos compartimentos de estudio de las células Treg: la sangre periférica y los sitios de inflamación, siendo el fluido sinovial el mejor estudiado. Existe una gran controversia acerca de la frecuencia de células Treg encontrada en sangre periférica de pacientes con AR cuando se compara con controles sanos. Mientras algunos autores encuentran niveles incrementados (102;103), otros los han encontrado disminuidos(104-108) o incluso equivalentes en ambos grupos (109-112), probablemente debido a las diferentes metodologías y marcadores utilizados y a la heterogeneidad de los pacientes. Sin embargo, existe un

amplio consenso en cuanto a los niveles incrementados de células T reguladoras en el fluido sinovial en relación a los encontrados en sangre periférica (103;112-114).

El incremento de las Treg en la articulación inflamada no parece estar asociado con la duración, la severidad de la enfermedad o el tratamiento (104) habiéndose postulado que el incremento en la frecuencia de células Treg en el sinovio podría ser consecuencia de un reclutamiento preferencial y selectivo de estas células hacía la articulación sinovial (161).

Sin embargo, varios trabajos han confirmado que las Treg en AR presentan un deterioro en sus funciones, pues a pesar de suprimir la proliferación de células T CD4+CD25- autólogas no son capaces de inhibir la secreción de citocinas proinflamatorias tales como IFN γ y TNF α (109;115). Esta función defectuosa podría estar mediada por el efecto inhibitorio que ejercen algunos componentes del ambiente del sinovio inflamado, como las citocinas, muchas de las cuales se encuentran alteradas en pacientes de AR.

De este modo, muchos de estos mediadores inflamatorios actuarían induciendo resistencia de células efectoras a la supresión mediada por células Treg (116;117). En este contexto, ensayos in vitro han demostrado que la adición de altas concentraciones de TNF inhibe la función supresora de las células Treg por una disminución directa en la expresión de FoxP3, sin embargo, todas estas funciones fueron restauradas con la administración de terapia anti-TNF α (118). Esto es consistente con la reciente demostración de que el TNF α aumenta la localización de una proteína quinasa (PKC θ) necesaria para la total activación de las células T actuando como un regulador negativo de la función de las células Treg, lo que apoya la idea de que el TNF α tiene un efecto inhibitorio de la función T reguladora en la AR (119).

Otros autores asocian esta deficiencia a una mayor concentración del receptor GITR y su ligando (120;121) y a defectos en la expresión y función

de CTLA-4, molécula clave ligada a la función supresora. De este modo, se encontró una expresión de CTLA-4 más reducida en las células Treg de pacientes de AR en comparación con las de individuos sanos y además fue asociada con una disminución de la función (122). Polimorfismos genéticos en el gen CTLA-4 se han correlacionado con la susceptibilidad a la AR (123) y a otras enfermedades autoinmunes (124;125).

Por otro lado, se han postulado otros mecanismos ligados a la regulación y modificaciones epigenéticas del gen FoxP3 como posibles desencadenantes de la función defectuosa de las células Treg en AR. Citocinas como IL-6 y posiblemente otras como TNF α e IL-1 β promoverían la metilación de residuos CpG en el promotor del gen de FoxP3 disminuyendo la expresión de FoxP3 por células Treg.

Recientemente, nuevos estudios apuntan a la capacidad que poseen las células ya diferenciadas para re-programarse y convertirse en otros tipos celulares. En AR se cree que este proceso se llevaría a cabo desde células Treg a Th17, y podría deberse a la fuerte inestabilidad provocada por las condiciones proinflamatorias intrínsecas a esta enfermedad. La combinación de TGF β y determinadas citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6, favorecería la diferenciación hacia un fenotipo Th17, mientras que la presencia única de TGF β induciría la generación de células Treg (126). Trabajos recientes, muestran un incremento en el número de células Th17 y citocinas relacionadas (IL-17 IL-23, IL-6 y TNF α) y una disminución significativa en las frecuencias Treg en pacientes de AR activa en comparación con controles sanos (106;127).

1.2.3 Citocinas

Las citocinas son un grupo heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular que actúan como mediadores intercelulares. Tienen efectos pleiotrópicos que incluyen la regulación del crecimiento celular, el desarrollo, la diferenciación y activación, y por lo tanto están implicadas en

casi todos los procesos biológicos. En general, diferentes citocinas pueden ejercer funciones similares sobre un mismo tipo celular (redundancia). La mayoría de las citocinas son solubles, aunque algunas permanecen unidas a células. Por lo general, actúan a corta distancia y son capaces de producir respuestas inmediatas en las células diana mediante la activación de vías de señalización directas que afectan rápidamente a cambios en la transcripción de genes.

Su expresión está, en parte, genéticamente regulada, siendo la síntesis basal, en la mayor parte de los casos, muy reducida, y produciéndose en cantidades elevadas sólo cuando las células productoras son activadas y durante un periodo de tiempo muy corto. En muchos casos se han descrito variantes polimórficas funcionales en los promotores de las citocinas que regulan sus niveles de expresión, tanto basales como inducidos. Obviamente, el posible desbalance en la producción de estas citocinas afecta al equilibrio requerido para el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria, pudiendo favorecer en determinadas situaciones el desarrollo de autoinmunidad.

Alteraciones de citocinas en la Artritis Reumatoide.

Las citocinas actúan formando una compleja red que regula los procesos implicados en la inflamación crónica y la destrucción del tejido en la AR, por lo que muchas citocinas se han asociado a la patogenia de esta enfermedad por jugar un papel regulador y efector en la respuesta inflamatoria en estos pacientes. Entre las citocinas cuya producción se ha visto alterada en AR se incluyen moléculas proinflamatorias como IL-18, IL-6, IL-1, IL-17, y TNF α y otros mediadores antiinflamatorios como TGF β o IL-10.

La concentración de citocinas en sangre periférica de pacientes con AR es baja cuando se compara con las encontradas en el fluido sinovial, lo cual, apoya la hipótesis de la migración selectiva de células secretoras de

citocinas hacía las articulaciones, donde juegan un papel fundamental en la sinovitis reumatoide. Se han encontrado niveles elevados de IL-18 e IL-6 en suero y líquido sinovial (128-130) fuertemente correlacionados con reactantes de fase aguda y distintos parámetros de actividad de la enfermedad (131) (132). La IL-18, junto al IFN γ , actúa incrementando la secreción de IL-1 β y TNF α , citocinas clave que estimulan la producción de otros mediadores inflamatorios e inhiben la producción de citocinas anti-inflamatorias, como IL-10 e IL-4. Aunque el IFN γ ha sido detectado a niveles relativamente bajos en las células T sinoviales de pacientes (133;134), es considerada una citocina clave en la diferenciación hacía células Th1 con una relevancia manifiesta en la susceptibilidad y severidad en la AR (135;136). La IL-6 actúa promoviendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea, y al igual que el TNF, IL-1, IL-17, IL-23 e IL-18 estimula la expresión de moléculas como RANKL (137) promocionando la osteoclastogénesis y la destrucción ósea. A nivel celular también actúa promoviendo la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas secretoras de autoanticuerpos. Nuevos trabajos han puesto de manifiesto la gran importancia de las células Th17 en la patogenia de la AR. De forma relevante, cabe destacar el papel sinérgico y/o aditivo que la IL-17 desarrolla junto a la IL-1 β y el TNF α induciendo la expresión de otras citocinas proinflamatorias, MMPs y quimiocinas, promoviendo la inflamación del tejido, la degradación del cartílago y la destrucción ósea (138).

Característicamente, el TGF β es considerado una citocina multifuncional con importantes efectos inhibidores sobre los procesos inflamatorios (139) y moduladores de la respuesta inmune, que actúa inhibiendo la proliferación de células T CD4 $^{+}$ o células Th en líquido sinovial (140). Sin embargo, no son pocos los trabajos que inclinan la balanza hacía los efectos pro-inflamatorios del TGF β debido a su implicación en la diferenciación de las células Th17.

En este trabajo nos centraremos especialmente en el estudio de la IL-10 y el TNF α , dos citocinas mutuamente reguladas que presentan

polimorfismos en sus promotores capaces de regular su producción y poseen funciones en gran medida antagónicas en la respuesta inflamatoria.

1.2.3.1. La IL-10

Fue descrita en primer lugar como un factor capaz de inhibir la secreción de IFN γ por parte de clones Th1 y denominada CSIF (factor inhibitorio de la síntesis de citocinas). Es una proteína de 178 aminoácidos, que está formada por un homodímero de unión no covalente. El gen de la IL-10 se localiza en el cromosoma 1 (q31-q32) y es altamente polimórfico.

Esta citocina es sintetizada por monocitos, macrófagos y linfocitos T, entre otros tipos celulares, y es considerada la citocina inmunosupresora por excelencia, ya que su principal efecto es disminuir la respuesta inflamatoria actuando sobre monocitos, macrófagos y células dendríticas. Capaz de inhibir la síntesis de citocinas (IL-1 α y β , IL-6, IL-18, TNF α y la propia IL-10), quimiocinas y otros mediadores inflamatorios implicados en la inflamación, actúa disminuyendo la producción de metaloproteinasas e inhibiendo la actividad angiogénica (141;142). Es capaz de aumentar la supervivencia de las células B a través de la expresión del factor antiapoptótico Bcl-2 (143) y favorece la producción de inmunoglobulinas y la replicación del ADN (144). Otro de sus efectos es el de actuar regulando la presentación antigénica por parte de monocitos y macrófagos, disminuyendo la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 (145;146), impidiendo la proliferación de linfocitos T CD4+ e inhibiendo la producción de mediadores como IL-2, TNF α , IFN γ y GM-CSF (147;148). La IL-10 también inhibe la producción de IFN γ e IL-2 por células Th1, y de IL-4 e IL-5 por células Th2 mediante la interacción de la señalización B7: CD28 (149;150).

Existe una gran variabilidad entre individuos en cuanto a la producción de IL-10, estimándose un componente genético de aproximadamente un 70% (151). Su expresión está genéticamente regulada por polimorfismos presentes en la región reguladora. Entre ellos podemos

destacar los que afectan a la posición -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), existiendo un desequilibrio de ligamiento entre los alelos presentes en las posiciones -819 y -592, y encontrándose en poblaciones caucasoides únicamente 3 haplotipos funcionales (GCC, ACC y ATA), asociados con distintos niveles en la producción de IL-10. Concretamente, los individuos con genotipo GCC/GCC presentan los niveles más elevados, GCC/ATA, GCC/ACC los intermedios y ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA los más bajos, tanto a nivel basal como inducido. Especialmente relevante parece ser, por lo tanto, el polimorfismo en la posición -1082 de forma que los individuos que presentan el genotipo GG muestran la mayor producción, seguidos de los AG y siendo el genotipo AA el más bajo productor (152;153).

La IL10 en artritis reumatoide.

Los monocitos de sangre periférica y las células mononucleares del líquido sinovial de pacientes con AR producen espontáneamente más IL-10 que los de individuos sanos y también se han encontrado altas concentraciones en suero y líquido sinovial en pacientes comparados con los controles (154). Sin embargo, su posible papel en la etiopatogenia de esta enfermedad no es conocido. De hecho, se ha descrito que los cultivos de células de la membrana sinovial liberan espontáneamente IL-10 al igual que IL-1 β y TNF α y que la neutralización de la IL-10 da como resultado un aumento de las dos citocinas proinflamatorias, lo que sugiere que la IL-10 actuaría constitutivamente como un supresor natural de IL-1 β y TNF α (155).

Otros estudios ponen de manifiesto la importancia de sus propiedades sobre la estimulación de linfocitos B y la producción de autoanticuerpos (148;156). En el suero de pacientes con AR, los niveles de IL-10 se correlacionan con los títulos de factor reumatoide (154) y la producción de éste se ha encontrado dependiente de IL-10 (157) lo que sugiere que podría contribuir en la progresión de la enfermedad promoviendo reacciones autoinmunes humerales.

Varios trabajos han analizado la relación de los polimorfismos de la IL-10 con la presencia y gravedad en la AR, pero los resultados no han sido consistentes. Por un lado, varios estudios no encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de los genotipos en la posición -1082 IL-10 entre controles y pacientes (158-160) y otros encontraron frecuencias tanto elevadas como disminuidas del genotipo alto productor de esta citocina (161-163). Por otra parte, se ha descrito que pacientes seronegativos portadores de genotipos altos productores de IL-10 presentan una mayor tasa de destrucción de las articulaciones asociada con un mayor daño radiográfico (164).

1.2.3.2. El TNF α

La importante actividad proinflamatoria de esta citocina fue descubierta inicialmente en el suero de ratones tratados con LPS, al ser capaz de inducir necrosis hemorrágica de ciertos tumores (165). El TNF α es un homotrímero de 51 kD, sintetizado como proteína de membrana no glicosilada principalmente por monocitos activados, aunque linfocitos T activados, células *natural killer* (NK) y mastocitos también lo sintetizan (166). Dentro de las acciones biológicas de esta molécula destaca su papel en la respuesta de fase aguda, participando en el reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos (167).

La síntesis del TNF α puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, tales como virus, parásitos, bacterias, células tumorales, isquemia, trauma e irradiación, así como por citocinas tales como IFN γ , IL-1, IL-2, IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor activador de plaquetas (PAF) y el mismo TNF α , que de manera autocrina puede potenciar su producción. El efecto pleitrópico del TNF α tiene como resultado la síntesis de citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN γ , TGF β), PAF, leucotrienos, proteínas de fase aguda y hormonas (cortisol, epinefrina, glucagón, insulina, norepinefrina). Muchos de los mediadores inducidos por el TNF α , como IL-10, IL-6,

prostaglandina E2 y cortisol, actúan a su vez como inhibidores de su expresión.

El gen que codifica para el TNF α se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, en la zona del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), en el *locus* TNF donde también se ubican los genes de la linfotóxina (LT) α y LT β , aproximadamente a 1.000 kb de los genes HLA-DR.

El TNF α presenta variaciones interindividuales en sus niveles de producción que poseen una elevada heredabilidad (151). Se han descrito polimorfismos en el gen del TNF α y sus regiones reguladoras, unos son mutaciones puntuales de un solo nucleótido (SNP) y otros afectan a las regiones microsatélites.

De los SNPs identificados en la región promotora del gen del TNF α destacan: -1031 T/C, -863 C/A, -857 C/A, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, -238 G/A, y -49 G/A (168;169). De todos ellos, el que ha despertado mayor interés es el que afecta a la posición -308 de la región promotora, que define los genotipos TNF1 (-308*G) y TNF2 (-308*A) (170). Aunque los estudios realizados sobre la influencia de este polimorfismo en la producción de TNF α han resultado contradictorios, la mayoría de los autores consideran que la presencia de una A en la posición -308 se asocia con una producción de la citocina mayor que los que llevan el alelo G (167;171;172). Además, este alelo se asoció con niveles más elevados de ARNm en condiciones basales (153). Estos polimorfismos pueden por tanto afectar a los niveles de TNF α , generando un desbalance en el equilibrio de citocinas y favoreciendo de esta manera estados patológicos.

El TNF α en la artritis reumatoide

En las articulaciones inflamadas, el TNF α constituye el principal factor de crecimiento de fibroblastos y es producido fundamentalmente por macrófagos activados en la membrana sinovial inflamada. Entre sus

muchos efectos en la articulación reumatoide cabe destacar su capacidad para inducir la producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 e IL-18, además de GM-CSF y quimiocinas, como IL-8, MCP-1, RANTES y SDF-1, implicadas en la acumulación leucocitaria en los tejidos inflamados. Este proceso es facilitado por la estimulación de moléculas de adhesión e integrinas (E-selectina y VCAM-1) en el endotelio. Además, promueven la actividad de los osteoclastos y la liberación de MMPs (metaloproteasas) por fibroblastos sinoviales que conduce a la reabsorción ósea y que trae como consecuencia la destrucción del cartílago y hueso subyacente (173;174). También produce muerte celular (apoptosis) en determinados tipos celulares.

En modelos murinos se ha descrito que la artritis inducida por colágeno es acelerada por la inyección de TNF α y se caracteriza por la destrucción ósea y del cartílago, y por la infiltración de leucocitos. Este efecto fue confirmado por Neidel y col. (175), quienes reportaron que los pacientes con AR que presentaban destrucción ósea tenían mayores niveles de TNF α en el líquido sinovial que los pacientes sin destrucción ósea. Se han detectado niveles elevados de esta citocina en el suero y líquido sinovial de pacientes con AR (170;174;176-179), y su concentración en sangre se correlacionó en algún caso con distintos parámetros de actividad de la enfermedad (180).

Sin embargo, a pesar del importante papel que juega esta citocina en la patogenia de la AR, los estudios realizados sobre la implicación de los polimorfismos genéticos que controlan su producción en la susceptibilidad y severidad de la AR no son concluyentes (181-184). No obstante, hasta el momento, casi todos los estudios sobre el SNP -308TNF α y la respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF α apuntan a una mejor respuesta de los pacientes con genotipo bajo productor (GG) (182;183;185;186), habiéndose demostrado un beneficio clínico significativo que podría permitir incluso detener la progresión de la enfermedad en los pacientes respondedores (187;188).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Numerosas evidencias respaldan la existencia de factores genéticos no asociados a las moléculas de HLA que podrían estar implicados en el desarrollo y la evolución de la artritis reumatoide. Por otra parte, se ha sugerido que alteraciones en la producción de citocinas y en las poblaciones de linfocitos T reguladores podrían estar relacionadas con la evolución y respuesta al tratamiento de estos pacientes.

En este trabajo nos centramos en el análisis de dos polimorfismos funcionales presentes en los promotores de dos citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria, la IL-10 y el TNF α , con la finalidad de determinar su posible influencia sobre la susceptibilidad, evolución y respuesta al tratamiento de la artritis reumatoide, y prestando una atención especial al estudio de las alteraciones en citocinas y células reguladoras de estos pacientes. Para ello nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de los polimorfismos -1082G/A de la IL-10 y -308G/A del TNF α sobre
 - la susceptibilidad
 - las características clínicas e inmunológicas al diagnóstico
 - la respuesta al tratamiento.
2. Analizar los niveles de citocinas y células T reguladoras en pacientes al diagnóstico y durante la evolución de la enfermedad.
3. Evaluar la influencia de los genotipos de la IL-10 y el TNF α sobre la producción de citocinas y la expresión FoxP3.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y controles

Para la realización de este estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Ética Regional. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado previo a la realización del estudio donde se garantizó el anonimato de sus datos.

La población control se seleccionó aleatoriamente entre los donantes que acudieron al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias. Los pacientes fueron diagnosticados de AR según los criterios de la ACR y evaluados en la Consulta de Diagnóstico Precoz del Servicio de Reumatología al Servicio de Inmunología del HUCA, registrándose los datos referentes al tratamiento, parámetros demográficos (edad, sexo) y características clínicas tanto al diagnóstico como en las sucesivas visitas, concertadas cada 3 meses aproximadamente. En el momento de la toma de la muestra se obtuvieron los siguientes datos:

- **HAQ:** cuestionario que evalúa la capacidad funcional del paciente (0-3).
- **Duración de la rigidez matutina:** considerado un parámetro de mal pronóstico cuando es superior a 45 minutos.
- **Número de articulaciones dolorosas y tumefactas:** se prevé mal pronóstico de la enfermedad cuando es mayor de 6-8 articulaciones.
- **Reactantes de fase aguda:** se consideran indicadores de mal pronóstico cuando los niveles son superiores a: 28-30 mm/horas para la Velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG), y 0,5 mg/dl para la Proteína C reactiva (PCR).
- **Medidas de dolor y del estado global de la enfermedad por el paciente** evaluados según una escala visual analógica (EVA) siendo el rango para el primero 1-10 y para el segundo 1-100.
- **Valoración subjetiva del paciente.**

- **Presencia y título de auto-anticuerpos:** Factor Reumatoide isotipo IgM (FR > 20 KU/L) y anticuerpo anti- péptido cíclico citrulinado 2 (anti-CCP2 >25 UA/mL)
- **Presencia del epítipo compartido (EC) HLA-DRB1.** Se considera positivo cuando presenta al menos uno de los alelos 01* o 04*.
- **Radiología.** Presencia o no de erosiones articulares y/o pinzamiento en articulaciones, evaluada por médico radiólogo y reumatólogo de acuerdo con el método SENS (*Simple Erosion Narrowing Score*).
- **Tratamiento:** Tipo de tratamiento y dosis. Metotrexato, Leflunomida, Prednisona, Cloroquina, Sulfasalazina, bloqueantes del TNF (Etanercept, Infliximab). Las reacciones adversas a los medicamentos fueron registradas en detalle.
- **Índice de actividad de la enfermedad, DAS28:** se calcula a partir del número de articulaciones dolorosas y tumefactas (sobre un total de 28 articulaciones), VSG y la evaluación global de la enfermedad efectuada por el paciente). Se considera que un paciente entra en remisión cuando su puntuación DAS28 es menor a 2,6 (3) .
- **Índice de respuesta al tratamiento, ACR:** determina el logro de mejoría porcentual de un 20, 50 o 70%, en relación a la evaluación basal.

En algunos pacientes se realizó un seguimiento durante 6 meses tras los cuales se determinó de nuevo la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, según los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología.

Los datos recopilados se reunieron en una base de datos de pacientes y controles que se utilizó para la realización de los estudios pertinentes.

3.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica

Las muestras sanguíneas de pacientes y controles se recogieron en tubos de EDTA y se procedió a la lisis de eritrocitos mediante una solución que contenía 1mM de NH_4CO_3 y 100 mM $\text{NH}_4 \text{Cl}$ durante 15 minutos a 4

°C. Pasado este tiempo se centrifuga 15 minutos a 3500 rpm a 4 °C, descartando el sobrenadante y conservando el precipitado. Se repite todo el proceso otras dos veces más y después de lavar del precipitado con agua destilada se resuspende en una solución de lisis de células blancas (100mM Tris, pH8, 100mM EDTA pH 8, 50mM ClNa) con un 1% SDS y 0,5% de pronasa y se incuba toda la noche a 37 °C. A continuación se precipitan las proteínas y restos celulares por la adición de 0,5 volúmenes de ClNa 6M y se centrifuga a 3000 rpm conservando el sobrenadante. Seguidamente se provoca la precipitación del ADN al añadir dos volúmenes de etanol al 96%. Se recoge e incuba durante 1 hora con etanol al 70% y posteriormente se deja secar y se disuelve en agua destilada manteniéndola durante 2-4 días a 4°C.

Una vez obtenido el ADN, se procede a su cuantificación usando el espectrofotómetro (*Nanodrop*, Thermo Fisher Scientific). Se diluyen las muestras en agua destilada y a la misma concentración (5ng/μL) para proceder a su genotipado.

3.3 Determinación de polimorfismos genéticos de IL-10 y TNFα

Se determinaron los polimorfismos genéticos presentes en el promotor de la IL-10 (-1082G/A) y el TNFα (-308G/A) mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos e hibridación con sondas específicas de alelo, marcadas con fluoróforos. La presencia de cada alelo en homo o heterocigosis se determina analizando la temperatura de “melting” (T_m) de cada fragmento amplificado mediante la utilización de un termociclador a tiempo real (*LightCycler* Roche Molecular Biochemicals).

En cada reacción de PCR se usaron 10 ng de ADN (2 μl) en un volumen total de 12 μl, con 1,2 μl de buffer de PCR 10X (Taq ADN polimerasa y deoxinucleótidos trifosfato; Roche Diagnostics), MgCl₂ 4 mM, 0,5 μM de cada cebador, 0,2 μM de la sonda donante marcada con

fluoresceína (F) y 0,4 μ M de la sonda aceptora conjugada con LC Red-450 (Roche Diagnostics). Los oligonucleótidos usados como cebadores fueron 5' –ATC CAA GAC AAC ACT ACT AAG GC y 5' – ATG GGG TGG AAG AAG TTG AA para -1082 IL-10 y 5'-CCT GCA TCC TGT CTG GAA GTT A y 5'-CTG CAC CTT CTG TCT CGG TTT para -308 TNF α . Las sondas de hibridación (diseñadas por TIB MOLBIOL, Syntheselabor, Berlin, Alemania) fueron GGA TAG GAG GTC CCT TAC TTT CCT CTT ACC-F y LC RED640-CCC TAC TTC CCC CTCCCA AA para -1082 IL-10 y AAC CCC GTC CCC ATG CCC C-F y LC RED640-CAA AAC CTA TTG CCT CCA TTT CTT TTG GGGAC para -308 TNF α .

El proceso se lleva a cabo en varias etapas:

1. Preincubación, 10 minutos a 95 °C para activar el enzima (Taq ADN polimerasa) y reducir la formación de dímeros de oligonucleótidos.
2. Amplificación, 45 ciclos con las siguientes fases:
 - Desnaturalización mediante calentamiento a 95°C durante 6 segundos.
 - Hibridación por enfriamiento (IL-10: 67 °C; TNF α 57 °C) mantenido durante 10 segundos.
 - Elongación por calentamiento a 72°C durante 17 segundos para la IL-10 y 19 segundos para el -308 TNF α .
3. Curva de “Melting”, mediante calentamiento progresivo de 45°C a 95°C para la IL-10 y de 40°C a 85°C para el TNF α a partir de la cual se calcula la T_m.

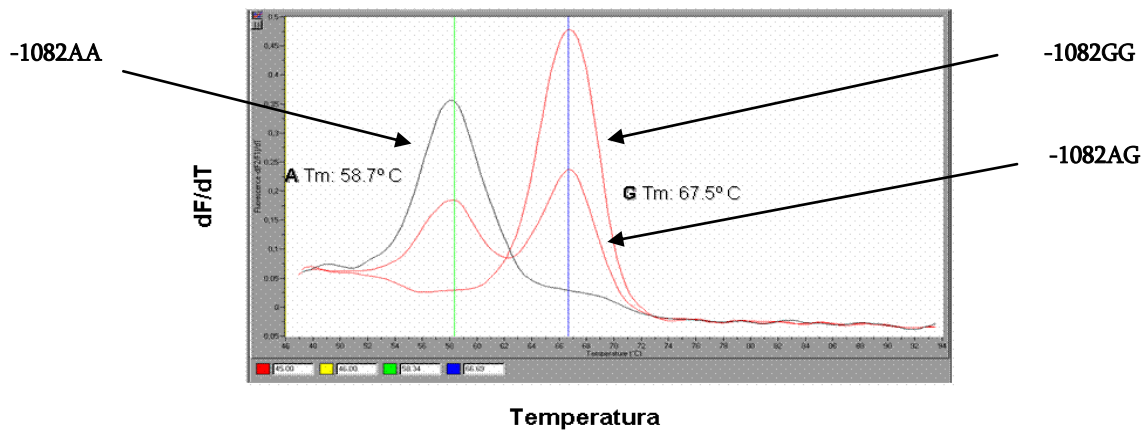


Figura 4: Representación de la derivada negativa de la fluorescencia frente a la temperatura de la curva de “melting” de cada alelo del polimorfismo $-1082A/G$ de la IL-10. Los homocigotos para uno u otro alelo presentan un único pico con distinta T_m y los heterocigotos una combinación de los dos picos. El esquema es similar al encontrado para el polimorfismo $-308A/G$ del $TNF\alpha$.

3.4 Cuantificación de citocinas

Los niveles séricos de citocinas se determinaron mediante ELISA. Para la cuantificación de los niveles de $TGF\beta$, IL-10, IL-6 e IL-17 se utilizaron kits comerciales de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (eBioscience, San Diego, CA). El límite de detección de estas citocinas fue de 11,9, 0,3, 0,4 y 1,5 pg/ml, respectivamente.

Los niveles de $TNF\alpha$ e IL-18 en el suero se midieron mediante la realización de un ELISA no comercial desarrollado en nuestro laboratorio, tal y como se describe a continuación. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante una noche con un anticuerpo monoclonal específico, anti- $TNF\alpha$ humano (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) o anti-IL-18 (MBL CO, Japón) en tampón carbonato (0,1 M; pH 9,6). Posteriormente se lavaron los pocillos con una solución de TBS (Tris Buffered Saline; 50 mM Tris, 150 mM ClNa, pH 7,4) con 0,05% de detergente Tween 20. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo con 2% de caseína en solución de TBS durante 3 horas a $37^\circ C$, y posterior lavado con la solución descrita

anteriormente. Tanto las muestras de suero como la curva patrón de TNF α (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) o IL-18 (MBL, CO, Japón) se incubaron 18 horas a 4°C. Tras el lavado de los pocillos se realizó una incubación de 2 horas con anti-TNF α (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) o anti-IL-18 (MBL, CO, Japón) humano conjugados con biotina. Tras un nuevo lavado, se incubaron los pocillos durante 1 hora con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Caltag Lab, Burlingame, USA), y se añadió su sustrato, *p*-nitrofenil fosfato (Sigma, USA) 1 mg/ml en tampón 1M dietanolamina, 1mM MgCl₂, 0,02% NaN₃, pH 9,8. El límite de detección fue 7,5 pg/ml para el TNF α e IL-18.

Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm y se llevó a cabo la determinación de la concentración de cada una de las citocinas presente en los sueros de pacientes y controles a partir de la curva patrón correspondiente.

3.5 Análisis fenotípico y cuantificación de células Treg

La expresión de los marcadores de células Treg en pacientes y controles se determinó mediante citometría de flujo multiparamétrica por tinción extra e intracelular.

En primer lugar, se realizó una la tinción extracelular a partir de 100 μ l de sangre contenida en tubos con EDTA que se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad con los anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos (anti-CD4 APC o PerCP (BD), anti-CD25FITC o PE (Miltenyi Biotec) y anti-CD127 PE-Cy7 (eBiosciencias)) o los correspondientes controles isotípicos que fueron usados para establecer la población negativa. A continuación se lisaron los eritrocitos usando 2 ml del buffer BD Pharm Lyse™ (5 min, 4 °C). La sangre lisada se lavó 2 veces (5 min, 1600 rpm) con PBS y un 1% de FCS antes de ser analizada.

Para la determinación de la expresión de FoxP3 se realizó posteriormente una tinción intracelular mediante el uso del *Human FoxP3*

Staining Kit (eBiosciences). Las células se resuspendieron en 1 ml de la solución fijadora y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Seguidamente las células se lavaron 2 veces en la solución de permeabilización y se añadió el anticuerpo anti-FoxP3 PE o el control isotópico correspondiente (BD o eBiosciences) incubando durante 30 min a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron de nuevo dos veces con la solución permeabilizadora antes de la adquisición y análisis por citometría de flujo.

La población linfocitaria se seleccionó de acuerdo con las propiedades de tamaño y granulosidad, y las células T CD4⁺ se seleccionaron usando anticuerpos anti-CD4. Los controles isotópicos se usaron para establecer la población CD25 negativa y las células T CD4⁺CD25⁺ se subdividieron en CD25^{low} y CD25^{high} de acuerdo a la intensidad de expresión de CD25. Un mínimo de 10.000 linfocitos T CD4⁺ se adquirió y analizó en el citómetro BD FACSCanto II mediante el software FACSDiva 6.1.2 (BD Pharmingen).

3.6 Análisis de citocinas intracelulares.

La acumulación de citocinas intracelulares se analizó por citometría de flujo después de la estimulación de las células aisladas en presencia de un inhibidor del aparato de Golgi.

Las células mononucleares (MNC) de sangre periférica se obtuvieron de *buffy coats* de controles sanos o de pacientes en tubos con heparina-Li. La sangre fue diluida previamente al 50% con PBS y las células se separaron mediante centrifugación de un gradiente de densidad usando *Ficoll* (Lymphoprep™, Noruega) a 2500 rpm durante 25 minutos a 21 °C. Las MNC se lavaron en PBS dos veces y el último lavado se realizó a 900 rpm (12 min) para eliminar las plaquetas y evitar agregados indeseados. Se resuspendieron a una concentración de 2×10⁶ células/ml en medio RPMI 1640 (Invitrogen, UK) suplementado con un 10% de FCS (Hyclone, USA), penicilina (20U/ml) y estreptomycin (20 microg/ml).

Las MNC se estimularon con 20 ng/ml de PMA y 500 ng/ml de ionomicina en presencia de monensin (2 μ M) (Sigma Aldrich) durante 5 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Tras este tiempo las células cultivadas se lavaron y marcaron extracelularmente con anti-CD4 APC (BD Pharmingen). A continuación se fijaron con 200 μ l de la solución fijadora *CytoFix* (BD Biosciences) durante 20 min a 4 °C en oscuridad y se procedió a su lavado con la solución permeabilizadora *CytoPerm* (BD Biosciences). A continuación se resuspendieron en 100 μ l de la misma solución, donde se añadieron los correspondientes anticuerpos monoclonales: anti-IL10 PE (BD Pharmingen) y anti-TNF α PerCP-Cy5.5 (eBioscience) o con anti-IL17 PE y anti-IFN γ PerCP-Cy5.5 (ambos de eBioscience). Se incubaron durante 30 min a 4 °C en oscuridad y las células se lavaron de nuevo dos veces con la solución permeabilizadora antes de ser analizadas por citometría de flujo.

3.7 Análisis de la expresión génica.

En un primer momento se llevó a cabo la extracción del ARNm procedente de muestras de sangre recogidas en tubos con EDTA de pacientes y controles sanos. Se llevó a cabo la lisis celular con la solución estabilizadora de ácidos nucleicos *RNA/DNA Stabilization reagent for Blood/Bone Marrow* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El lisado celular se congeló a -20 °C hasta su uso. El RNAm se aisló mediante separaciones magnéticas usando el *mRNA isolation kit for blood/bone marrow* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ARNm se llevó a cabo la transcripción reversa utilizando el *kit Reverse -iT RTase Blend* (ABgene, Reino Unido). El ADNc obtenido se conserva a -70°C hasta su uso.

La cuantificación de la expresión génica de FoxP3 se realizó mediante PCR a tiempo real en el termociclador LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Para ello, se utilizó el kit de amplificación y

marcaje *FastStart ADN Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals). Las unidades obtenidas de FoxP3 se relativizaron respecto al gen de la cadena ϵ de CD3. En todas las amplificaciones se introdujo además un control negativo sin ADNc. Los oligonucleótidos usados fueron 5'- GAA ACA GCA CTA TCC CAG AGT TC y 5'- ATG GCC CAG CGG ATG AG para FoxP3 y 5'- CGT TCA GTT CCC TCC TTT TCT T y 5'- GAT TAG GGG GTT GGT AGG GAG TG para CD3.

3.8 Análisis estadísticos

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (versión 15.0) o GraphPad Prism (versión 4.0).

Para determinar la asociación de los polimorfismos estudiados y la susceptibilidad a la AR se utilizaron tablas de contingencia y test χ^2 . En los experimentos en los que se confirmó la normalidad de las variables (mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov) los resultados se expresan como media \pm desviación estándar o rango. En estos casos la comparación de los valores medios se hizo mediante la prueba T de Student o ANOVA para variables continuas. Cuando no existía normalidad de las variables los resultados se expresaron como mediana (rango intercuartílico) y se llevaron a cabo test no paramétricos, test de U de Mann-Whitney o test de la varianza de Kruskal-Wallis cuando quisimos comparar más de 2 grupos. En este caso, cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó un segundo test de ajuste para múltiples comparaciones o test de Dunn's. Para el estudio del resto de variables cualitativas se llevaron a cabo tablas de contingencia y se determinó el χ^2 correspondiente.

Para examinar las posibles relaciones entre las distintas variables estudiadas se utilizó el Test de correlación de Spearman.

La comparación de medias entre la cantidad de células CD25-FoxP3+ antes y después del tratamiento fue evaluada mediante la prueba no paramétrica del test Wilcoxon para muestras relacionadas.

Los estudios de la asociación de los polimorfismos genéticos con el desarrollo de autoanticuerpos y con la respuesta a tratamiento (ACR) fueron analizados mediante regresión logística binaria univariante y posterior análisis multivariante por pasos hacia atrás (*backward multistep*), para llegar a un modelo con un determinado valor predictivo que permitiese determinar la influencia de otras variables. Se calculó la *odds ratio* para determinar el riesgo de aparición de cada variable, con un intervalo de confianza del 95%.

Finalmente, el análisis por regresión lineal univariante permitió estudiar la posible correlación entre el polimorfismo de la IL-10 y la respuesta al tratamiento así como determinar la influencia de diferentes parámetros clínicos y demográficos sobre la cantidad de células CD25-FoxP3+, realizándose posteriormente el ajuste de los modelos mediante regresión lineal multivariante para comprobar la influencia de otros factores en la asociación. Se calculó el coeficiente de regresión lineal β y el intervalo de confianza al 95%. En todos los casos, se tomaron como significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efecto del genotipo de la IL-10 y el TNFa sobre la susceptibilidad y la respuesta al tratamiento en pacientes de AR

Artículo 1: Banesa de Paz, Mercedes Alperi-López, Francisco J Ballina-García, Catuxa Prado, Lourdes Mozo, Carmen Gutiérrez, Ana Suárez. *Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-alpha Genotypes in Rheumatoid Arthritis - Association with Clinical Response to Glucocorticoids*. The Journal of Rheumatology 03/2010; 37(3):503-11. DOI:10.3899/jrheum.090566.

Aportación personal al trabajo: en éste trabajo mi labor consistió en la recolección de los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes y de las muestras sanguíneas de pacientes y de una parte de los controles. Así mismo, llevé a cabo las determinaciones y análisis genéticos. Por último, el análisis e interpretación de resultados, así como la elaboración del manuscrito lo realicé bajo la supervisión de la Dra. Ana Suárez.

Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor- α Genotypes in Rheumatoid Arthritis — Association with Clinical Response to Glucocorticoids

BANESA de PAZ, MERCEDES ALPERI-LÓPEZ, FRANCISCO J. BALLINA-GARCÍA, CATUXA PRADO, LOURDES MOZO, CARMEN GUTIÉRREZ, and ANA SUÁREZ

ABSTRACT. Objective. There are dysregulated levels of interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rheumatoid arthritis (RA), and their role in the disease is controversial. We analyzed the association of functional polymorphisms of IL-10 and TNF- α with susceptibility and disease characteristics at the time of diagnosis, and we also evaluated their possible use as predictors of clinical response to treatments.

Methods. Patients with recent-onset RA (n = 162) and healthy controls (n = 373) were genotyped for -1082 IL-10 and -308 TNF- α polymorphisms and data were related to clinical and immunological measurements of patients at the time of diagnosis. Response to treatment after 6 months was determined in 125 patients by the absolute change in Disease Activity Score (DAS28) and the American College of Rheumatology criteria for improvement.

Results. We found a reduced frequency of the low IL-10 producer genotype (-1082AA) in patients with RA compared to controls (26.5% vs 38.9%; p = 0.006), while it is a risk factor for anticyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) positivity (p = 0.028). Evaluation of clinical response to treatments indicated that carriage of the high IL-10 genotype was associated with a favorable outcome (p = 0.009), specifically to prednisone therapy (p = 0.0003). No significant effects were observed with TNF- α polymorphism alone; however, in combination with the IL-10 genotype, it increased the strength of these associations.

Conclusion. Results show an association between the low IL-10 producer genotype and protection from RA; nevertheless, when other specific genetic and/or environmental factors trigger onset of RA, this genotype may predispose to development of anti-CCP+ RA disease with reduced response to prednisone treatment. (J Rheumatol First Release Jan 15 2010; doi:10.3899/jrheum.090566)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS

CYTOKINES

POLYMORPHISMS

ANTICYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE ANTIBODIES

CORTICOSTEROIDS

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common autoimmune inflammatory rheumatic disorder. Although the etiology of the disease is unknown, genetic as well as environmental factors contribute to susceptibility and severity. The genetic

contribution is estimated to be 50%–60%¹, with the HLA region having an important influence on genetic risk, in particular, HLA-DRB1 alleles encoding the shared epitope (SE) sequence. However, the contribution of the MHC represents no more than 30%–50% of the total genetic background², pointing to the relevance of other susceptibility genes³. Several cytokines have been associated with the pathogenesis of RA and have played a regulator and effector role in the inflammatory response of this pathology⁴. Since the production of these molecules is controlled at the genetic level, functional polymorphism in their promoters could influence the development and severity of the disease. In particular, the production of interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), 2 mutually regulated cytokines involved in inflammatory responses, has been found to be dysregulated in patients with RA. Genetic polymorphisms at the promoter of both genes have been associated with different findings of cytokine production. The presence of the -1082G* allele on the IL-10 gene and the

From the Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo; and Department of Rheumatology and Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI052409 and PI080570), FICYT (IB08-091), and Roche Farma S.A.

B. de Paz, BSc; C. Prado, BSc; A. Suárez, PhD, Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo; M. Alperi-López, MD; F.J. Ballina-García, MD, Department of Rheumatology; L. Mozo, PhD, Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias; C. Gutiérrez, PhD, Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo, Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias.

Address correspondence to Dr. A. Suárez, Facultad de Medicina, Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain.

E-mail: anasua@uniovi.es

Accepted for publication October 9, 2009.

–308A* allele at the TNF- α promoter were associated with the highest basal and induced cytokine production⁵⁻⁸. Although these single-nucleotide polymorphisms (SNP) have been studied in patients with RA⁹⁻¹⁶, their role in the etiopathogenesis of the disease remains unclear owing to the conflicting results reported.

A central feature of RA is the presence of a number of autoantibodies, although only 2 systems are used in clinical practice: the rheumatoid factor (RF), usually of the IgM isotype and directed at the Fc region of IgG molecules, and the antibodies directed against cyclic citrullinated peptides (anti-CCP), more recently incorporated, but which are the most specific autoantibodies for RA¹⁷. In addition, anti-CCP antibodies may be detected years before disease onset¹⁸, are stable over time¹⁹, and are associated with joint destruction^{20,21}. An increasing number of studies have supported the prognostic potential of these autoantibodies and suggest that their presence at disease onset may predict radiological damage and disease severity^{18,19-21}. However, little is known about the factors involved in their development.

After onset of RA, an important requisite for a favorable outcome is to achieve early suppression of inflammation. In clinical practice, however, a sizable proportion of patients fail to respond adequately to therapies. The identification of genetic predictors of treatment response would thus provide valuable clinical information, because they can be determined at the time of diagnosis, when therapeutic intervention has the potential to offer the greatest benefits. We analyzed the association of functional IL-10 and TNF- α polymorphisms with RA susceptibility and with clinical and immunological features of patients at the time of diagnosis, and we also evaluated their possible use as predictors of clinical response to treatments.

MATERIALS AND METHODS

Patients. The study population included 162 patients with RA (116 women and 46 men; mean age 57.25 ± 15.01 yrs) consecutively recruited from the Early Arthritis Diagnosis outpatient clinic of the Hospital Central de Asturias, a unit that treats patients with RA for 3 years from the start of symptoms (median duration of disease at the time of sampling was 6 months). All patients were diagnosed with RA according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria²². Clinical and laboratory results at the time of diagnosis and during the followup period were recorded. The healthy control group consisted of 373 unrelated blood donors (214 women and 159 men; mean age 49.76 ± 12.21 years). All patients and controls were of Caucasian origin. Approval for the study was obtained from the regional Ethics Committee for Clinical Investigation and all determinations were performed with fully informed written consent, the anonymity of the data being guaranteed.

Promoter polymorphism genotyping. DNA was obtained from peripheral blood cells of patients and controls by standard procedures. SNP at positions –1082 on the IL-10 gene and –308 on the TNF- α gene were determined after amplification and hybridization with fluorescent-labeled probes (LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), as reported⁷. The primers used were 5'-ATC CAA GAC AAC ACT ACT AAG GC and 5'-ATG GGG TGG AAG AAG TTG AA for –1082 IL-10 and 5'-CCT GCA TCC TGT CTG GAA GTT A and 5'-CTG CAC CTT CTG TCT CGG TTT for –308 TNF- α . The hybridization probes (designed by TIB MOLBIOL,

Berlin, Germany) were GGA TAG GAG GTC CCT TAC TTT CCT CTT ACC-F and LC Red 640-CCC TAC TTC CCC CTC CCA AA for –1082 IL-10 and AAC CCC GTC CCC ATG CCC C-F and LC Red 640-CCA AAC CTA TTG CCT CCA TTT CTT TTG GGG AC for –308 TNF- α .

Clinical and laboratory examinations. Data from physical and laboratory examinations and radiographs of hands and feet at the time of diagnosis were recovered from the Early Arthritis Diagnosis clinic database. Clinical data were as follows: age at diagnosis; duration of morning stiffness; number of swollen and tender joints; patient's global status and pain, assessed by a horizontal visual analog scale, range 0–100 for global status and 0–10 for pain status; functional disability, evaluated using the Health Assessment Questionnaire, range 0 to 3; and Disease Activity Score 28 (DAS28), a validated composite index that included 28-joint counts. Laboratory evaluations included the presence of IgM RF (> 20 KU/l) and anti-CCP2 antibodies (> 25 U/ml), determined using commercial kits (Immunochemistry systems, Beckman Coulter, La Brea, CA, USA, and Immunoscan RA Anti-CCP kit, Euro-Diagnostica AB, Madeon, Sweden, respectively); quantification of erythrocyte sedimentation rate (ESR; mm/h) and C-reactive protein, measured using standard laboratory methods; and the presence of at least 1 SE allele on the HLA-DRB1 gene, determined in 147 patients by polymerase chain reactions using specific primers (Cycleplate System Protrans HLA-DRB1*, Protrans Medizinische, Hockenheim, Germany). To ascertain clinical response to treatments, DAS28 was also determined in 125 patients at the time of sample collection and 6 months later, calculating the absolute change in DAS28 (Δ DAS28) as a measure of treatment effectiveness. In addition, the percentage of ACR criteria for improvement (0, 20%, 50%, or 70%) was assessed in these patients at the end of the 6-month followup period. Achieving ACR70 was considered a good response to treatment.

Statistical analysis. The SPSS 15.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all calculations. Genotype frequencies were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium, tested by the chi-squared test, was confirmed by the control population, but a deviation was detected in patients and then evaluation of the data was performed using genotype frequencies. Genotype distribution between RA patients and controls was compared using 3×2 contingency tables and the chi-squared test. Differences in the frequency of genotypes were assessed by unconditional logistic regression and determination of risk. Clinical, immunological, and genetic measurements of patients were compared between sexes and cytokine genotypes using the chi-squared test for categorical variables and the Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U test and analysis of variance or the Student's t-test for continuous variables, after checking their normality by means of Kolmogorov-Smirnov tests. Linear regression analyses were performed to investigate the association between IL-10 genetic polymorphism and treatment response, defined as the absolute change in DAS28 after 6 months (Δ DAS28). A multivariate model was subsequently applied to determine the influence of different treatments and genetic, immunologic, or demographic factors as possible predictors of clinical response (Δ DAS28, dependent variable). Linear regression coefficient (B) and 95% confidence interval (CI) were used as an estimate of the association. Finally, the effect of immunogenetic measurements and clinical features on the presence of anti-CCP antibodies at RA diagnosis (dependent variable) and the association between good response to prednisone treatment (achieving an ACR70) and cytokine genotypes was determined by univariate binary logistic regression followed by a multivariate analysis (backward logistic regression modeling) to define the effect of other measurements. For the variable stepwise selection process, p values < 0.05 at entry and ≥ 0.1 for removal and classification cutoff of 0.5 were used. Estimation terminated when measurement estimates changed by < 0.001 . OR and 95% CI were used as an estimate of the risk. The level of significance was set at $p < 0.05$ for all analysis.

RESULTS

Association of cytokine genotypes with RA susceptibility and

clinical features at diagnosis. Clinical and laboratory characteristics of patients with RA at the time of diagnosis are shown in Table 1. The distribution of the -1082 IL-10 and -308 TNF- α SNP in the population with RA was compared with that in healthy controls (Table 2), revealing significant differences in IL-10 genotypes (3×2 contingency tables and chi-squared test, $p = 0.007$). Further, classification into low and high producer genotypes, as reported^{5,6}, showed a significantly lower frequency of the low IL-10 producer genotype in patients with RA. The deviation of genotype frequencies from Hardy-Weinberg proportion observed in patients can provide additional evidence for the association between RA and IL-10 SNP²³. No significant differences between patients and controls were observed in the frequency of -308 TNF- α polymorphism.

We subsequently investigated clinical and immunological characteristics at diagnosis of patients with RA. Some authors have reported gender differences in the disease phenotype among patients with RA; however, except for older age at diagnosis in men ($p = 0.029$), no significant gender differences were noted at diagnosis (Table 1). Moreover, comparison of clinical features between patients with different IL-10 genotypes (Table 3) showed that -1082GG patients presented later diagnosis (at age 61.25 ± 18.40 yrs), but separate analysis by sexes indicated that this association was present in men (GG: 70.71 ± 4.68 yrs vs AA/AG: 57.89 ± 14.06 yrs; $p = 0.022$), but not in women (56.15 ± 21.09 vs 53.88 ± 14.40 yrs; $p =$ nonsignificant). With the exception of slightly higher ESR levels in -1082GG patients, clinical measurements at diagnosis did not show significant differences between IL-10 genotypes. However, studies of immunological features showed a trend toward fewer autoantibodies, particularly anti-CCP, in patients with the

Table 2. Distribution of IL-10 and TNF- α genotypes in patients with RA and healthy controls. Differences between patients and controls were evaluated by contingency tables and chi-square test.

Genotype	Controls, n = 373 n (%)	Patients, n = 162 n (%)	p
-1082 IL-10			
AA	145 (38.9)	43 (26.5)	
AG	174 (46.6)	99 (61.1)	0.007
GG	54 (14.5)	20 (12.3)	
Low (AA)	145 (38.9)	43 (26.5)	0.006*
High (GG/GA)	228 (61.1)	119 (73.5)	
-308 TNF- α			
AA	8 (2.1)	0	
AG	77 (20.6)	30 (18.5)	0.136
GG	288 (77.2)	132 (81.5)	
Low (GG)	288 (77.2)	132 (81.5)	0.270**
High (AA/GA)	85 (22.8)	30 (18.5)	

* AA vs GG/GA, $p = 0.006$, OR (95% CI): 0.57 (0.38–0.85). ** GG vs AA/GA, $p = 0.270$, OR (95% CI): 1.30 (0.82–2.07).

-1082GG genotype. Further, separate analysis by sexes showed that this trend was present only in women (anti-CCP-positive, GG: 30.8%, GA: 55.4%, AA: 62.1%; RF-positive, GG: 46.2%, GA: 63.5%, AA: 62.1%), suggesting that the -1082 IL-10 genotype might be involved in the generation of anti-CCP antibodies in female patients with RA. No significant differences were observed in clinical or immunological features at diagnosis among patients with different TNF- α genotypes.

Association between cytokine genotypes and presence of anti-CCP antibodies at diagnosis. The presence of anti-CCP antibodies before appearance of the first clinical symptoms of RA has been reported¹⁸, suggesting their predictive value

Table 1. Patient characteristics at RA diagnosis. Values are the mean \pm SD except for number of swollen and tender joints, which are median (range), and RF, anti-CCP, and presence of HLA-DRB1, which are n (%). Differences between women and men were evaluated using the chi-square test for categorical variables and Mann-Whitney U test or Student t test for continuous variables.

Characteristics	All Patients, n = 162	Women, n = 116	Men, n = 46
Age at RA diagnosis (yrs)	55.76 \pm 15.01	54.14 \pm 15.20	59.84 \pm 13.84*
DAS28	5.85 \pm 0.043	5.78 \pm 0.942	6.01 \pm 1.26
Number of swollen joints	6.0 (0–23)	6.0 (0–22)	8.0 (2–23)
Number of tender joints	10.0 (0–27)	10.0 (0–25)	12.0 (3–27)
Duration of morning stiffness (min)	105.93 \pm 86.86	101.28 \pm 86.10	118.00 \pm 88.69
Global patient assessment	56.66 \pm 21.89	56.69 \pm 20.66	56.56 \pm 25.06
Patient pain assessment	6.10 \pm 2.08	6.13 \pm 2.16	6.02 \pm 1.89
HAQ score	1.37 \pm 0.66	1.36 \pm 0.65	1.40 \pm 0.72
CRP (mg/dl)	6.57 \pm 18.32	6.16 \pm 19.40	7.64 \pm 15.35
ESR (mm/h)	41.96 \pm 26.01	40.75 \pm 24.24	45.07 \pm 30.19
Presence of HLA-DRB1 SE	78 (53.1)	53 (50.0)	25 (61.0)
RF positivity	100 (61.7)	71 (61.2)	29 (63.0)
Anti-CCP positivity	90 (55.6)	63 (54.3)	27 (58.7)

* $p = 0.029$. DAS28: Disease Activity Score 28; HAQ: Health Assessment Questionnaire; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; RF: rheumatoid factor; CCP: cyclic citrullinated peptides.

Table 3. Clinical and immunological features at diagnosis in patients with RA, grouped by –1082 IL-10 genotype. Values are the mean \pm SD except for number of swollen and tender joints, which are median (range), and sex, presence of RF, anti-CCP, and SE in HLA-DRB1, which are n (%). Differences between genotypes were evaluated using the chi-square test for categorical variables and Mann-Whitney U test or Students t test for continuous variables.

	–1082 IL-10 Genotype		
	AA, n = 43	AG, n = 99	GG, n = 20
Age at diagnosis, yrs	54.11 \pm 14.13	55.36 \pm 14.54	61.25 \pm 18.40*
Sex			
Women	29 (67.4)	74 (74)	13 (65)
Men	14 (32.6)	25 (25.3)	7 (35)
DAS28	5.62 \pm 1.04	5.90 \pm 0.97	6.05 \pm 1.30
Number of swollen joints	5.0 (0–18)	6.0 (1–22)	7.5 (0–23)
Number of tender joints	10.0 (1–25)	11.0 (2–27)	9.0 (0–26)
Duration of morning stiffness (min)	105.08 \pm 86.12	103.97 \pm 85.59	116.55 \pm 97.47
Global patient assessment	54.60 \pm 21.35	57.06 \pm 22.01	58.85 \pm 23.17
Patient pain assessment	5.85 \pm 2.07	6.19 \pm 2.06	6.20 \pm 2.26
HAQ score	1.22 \pm 0.60	1.39 \pm 0.63	1.60 \pm 0.86
CRP (mg/dl)	4.42 \pm 11.38	6.45 \pm 18.96	11.80 \pm 25.79
ESR (mm/h)	35.32 \pm 22.88	42.56 \pm 24.81	53.30 \pm 34.07**
SE positivity	21 (55.3)	49 (54.4)	8 (42.1)
RF positivity	26 (60.5)	63 (63.6)	11 (55.0)
Anti-CCP positivity	24 (55.8)	57 (57.6)	9 (45.0)

* GG vs AA/AG; $p = 0.036$. ** GG vs AA; $p = 0.041$. DAS28: Disease Activity Score 28; HAQ: Health Assessment Questionnaire; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; SE: shared epitope; RF: rheumatoid factor.

and the relevance of knowing possible factors involved in their appearance. Thus we categorized women with RA into anti-CCP-positive and -negative groups at the time of diagnosis, and we used a logistic regression model to determine the possible association of genetic factors or clinical features at diagnosis with the presence of anti-CCP antibodies (Table 4). Results of the multivariate analysis (backward logistic regression modeling) indicated that early onset and presence of the –1082A* allele on the IL-10 promoter (low producer) were risk factors for appearance of anti-CCP. Although no significant effect was observed with –308 TNF- α SNP alone, carriage of the combined genotype indicative of the highest IL-10 production (high IL-10/low TNF- α : –1082 GG/–308 GG) exerted a significant protective effect (OR 0.13, 95% CI 0.02–0.69, $p = 0.017$). No association was found in men (data not shown).

IL-10 genotypes and clinical response to treatments. To evaluate the clinical effectiveness of treatment, DAS28 was determined in 125 patients with RA before and after 6 months of treatment, and the difference between initial and final DAS28 values (Δ DAS28) was used to measure clinical response. In addition, we determined the percentage of ACR criteria for improvement (0, 20%, 50%, or 70%) at the end of the 6-month period. Patient stratification by IL-10 genotype showed no significant differences in disease activity (initial DAS28) before the followup period ($p = 0.542$, analysis of variance test). However, linear regression analysis showed an association between the IL-10 genotype and Δ DAS28 (univariate regression coefficient 0.532, 95% CI

0.038–1.027, $p = 0.035$), with carriage of the –1082G* allele being a predictor of good response. To determine the possible influence of specific treatments and genetic, immunologic, or demographic factors on clinical response, a multivariate linear regression model was employed (Table 5). Results showed a significant influence of IL-10 alleles on clinical response ($p = 0.009$) after adjustment for the treatments followed during the period evaluated and for genetic, immunologic, and demographic factors. In addition to IL-10 SNP, a slight positive association with low producer TNF- α genotype and male sex was detected, so that patients with the combined genotype containing the –1082G* allele had the highest Δ DAS28 levels (–1082GG/–308GG, $n = 13$: 1.21 ± 2.1 ; –1082AG/–308GG, $n = 63$: 0.75 ± 1.62 ; and –1082AA/–308GG, $n = 27$: 0.56 ± 1.63). However, the most interesting result was that the use of prednisone was independently associated with a better DAS28 response ($p = 0.0003$).

Finally, to corroborate that a combination of IL-10/TNF- α polymorphisms could be useful to predict the effectiveness of prednisone treatment, we analyzed clinical response by evaluating the percentage of ACR criteria for improvement. For this purpose, we considered patients achieving ACR70 as good responders to therapy. We accordingly categorized patients with prednisone treatment ($n = 98$, mean dose \pm SD, 5.26 ± 1.81 mg/day), either alone or in combination with other agents, into 2 groups (ACR70 and ACR \leq 50). Logistic regression analysis (Table 6) showed that carriers of the –1082G* allele and the –308GG genotype (high

Table 4. Clinical and immunogenetic factors associated with presence of anti-CCP antibodies at diagnosis in women with RA. Values are the mean \pm SD except for number of swollen and tender joints, which are median (range), and sex, presence of RF, anti-CCP, and SE in HLA-DRB1, which are %. Differences were evaluated by logistic regression analysis using the presence of anti-CCP antibodies as dependent variable.

	Anti-CCP		Univariate Analysis		Multivariate Analysis*	
	Positive, n = 63	Negative, n = 53	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Age at RA diagnosis, yrs	51.79 \pm 16.05	56.92 \pm 13.75	0.98 (0.95–1.00)	0.072	0.96 (0.92–0.99)	0.012
DAS28 score	5.79 \pm 0.86	5.78 \pm 1.04	1.01 (0.68–1.51)	0.969		
Number of swollen joints	6.00 (0–18)	5.00 (1–22)	0.98 (0.90–1.07)	0.662		
Number of tender joints	10.00 (0–25)	10.00 (2–24)	0.96 (0.89–1.03)	0.231		
HAQ score	1.37 \pm 0.66	1.35 \pm 0.63	1.03 (0.57–1.87)	0.912		
CRP (mg/dl)	5.33 \pm 16.62	7.15 \pm 22.38	1.00 (0.98–1.01)	0.618		
ESR (mm/h)	42.71 \pm 24.35	38.43 \pm 24.12	1.01 (0.99–1.02)	0.343		
HLA-DRB1 SE						
Presence	29 (50.9)	24 (49.0)	1			
Absence	28 (49.1)	25 (51.0)	0.93 (0.43–1.99)	0.846		
–1082 IL10 genotype						
GG	4 (6.3)	9 (17.0)	1		1	
AA + AG	59 (93.7)	44 (83.0)	3.02 (0.87–10.43)	0.081	5.15 (1.21–21.97)	0.027
–308 TNF genotype						
GG	54 (85.7)	42 (79.2)	1			
AA + AG	9 (14.3)	11 (20.8)	0.64 (0.24–1.68)	0.361		
Combined IL-10/TNF- α genotype						
AA+AG/GG	51 (81.0)	34 (64.2)	1		1	
AA+AG/AA+AG	8 (12.7)	10 (18.9)	0.53 (0.19–1.49)	0.230	0.66 (0.19–2.18)	0.493
GG/GG	3 (4.8)	8 (15.1)	0.25 (0.06–1.01)	0.052	0.13 (0.02–0.69)	0.017
GG/AA+AG	1 (1.6)	1 (1.9)	0.67 (0.04–11.02)	0.777	0.92 (0.04–19.16)	0.958

* Backward logistic regression modeling. The variables entered in the initial model were the clinical and genetic measurements included in the table. The accuracy of the final prediction model was 71.0% for the analysis of single genotypes and 73% for the analysis of combined genotypes. CCP: cyclic citrullinated peptides; DAS28: Disease Activity Score 28; HAQ: Health Assessment Questionnaire; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; SE: shared epitope.

IL-10/low TNF- α producers) are the best responders to this treatment compared with patients with other combined genotypes. This association remained highly significant ($p = 0.001$) in the multivariate analysis (backward logistic regression modeling) after adjustment for prednisone dose, sex, and presence of anti-CCP antibodies.

DISCUSSION

Given the evident advantages of the use of genetic markers to predict the risk of disease onset and outcome, clarification of the role of IL-10 and TNF- α functional polymorphisms in RA remains a matter of considerable interest. We showed a reduced frequency of the low IL-10 producer genotype (–1082AA) in patients with RA, while it appears to be a risk factor for anti-CCP development. In accord with our results, this genotype was found to be underrepresented in patients with RA from a Polish and a Turkish population^{9,10}. Other authors did not observe differences in the distribution of IL-10 genotypes^{11–13,16}, while a high prevalence of the low IL-10 producer genotype was reported in a Swedish population with RA, although in that study genotype frequencies from healthy controls were significantly different from ours¹⁴. As regards the TNF- α genotype, no significant differences were found between patients and controls. Indeed, in spite of the important role that has been attributed to this cytokine in RA, the absence of a significant association of the –308

TNF- α SNP with disease susceptibility has been described by most authors^{10,15}.

IL-10 levels have frequently been found to be increased in patients with RA²⁴; however, the role played by this cytokine is still controversial. Although IL-10 is usually considered to mediate potent downregulation of the inflammatory responses, its ability to enhance systemic inflammation and to increase the production of proinflammatory molecules has also been reported²⁵. As a B cell stimulator, its role in autoimmunity has been traditionally focused on its potential to generate antibody-producing cells, thereby contributing to humoral immunity. In recent years, however, there has been growing interest in the contribution of antibody-independent functions of B cells to autoimmune responses. Indeed, memory B cells produce proinflammatory cytokines²⁶ and are responsible for an ectopic lymphoid neogenesis in the rheumatoid synovium, which was not associated with local production of RF or anti-CCP antibodies²⁷. It has been reported that high IL-10 producer genotypes are increased in patients with a higher rate of joint destruction²⁸ and are associated with more severe radiographic damage in patients who are anti-CCP-negative and RF-negative²⁹, thus supporting a detrimental effect of IL-10 unrelated to antibody production in patients with RA.

However, the finding of an association between the –1082A* allele and the presence of anti-CCP antibodies at

Table 5. Factors predicting response to treatment after 6 months defined as change in DAS28 (Δ DAS28). Multivariate linear regression analysis using Δ DAS28 as the dependent variable and adjusted for treatments followed during the 6-month followup period and demographic, genetic, and immunologic factors included in the table. $R^2 = 0.260$.

Predictor of Clinical Response	n (%)	Δ DAS28, mean \pm SD	Multivariate Linear Regression Coefficient (95% CI)	p
Age at diagnosis			-0.009 (-0.032-0.015)	0.466
Sex				
Women	88 (70.4)	0.43 \pm 1.50	0.734 (0.038-1.431)	0.039
Men	37 (29.6)	1.04 \pm 2.06		
-1082 IL-10 genotype				
AA	35 (28.0)	0.30 \pm 1.69	0.647 (0.169-1.126)	0.009
AG	74 (59.2)	0.63 \pm 1.63		
GG	16 (12.8)	1.18 \pm 1.98		
-308 TNF- α genotype				
GA/AA	22 (17.6)	-0.09 \pm 1.63	0.895 (0.040-1.750)	0.040
GG	103 (82.4)	0.76 \pm 1.68		
HLA-DRB1 SE				
Negative	56 (49.6)	0.44 \pm 1.71	-0.231 (-0.834-0.373)	0.450
Positive	57 (50.4)	0.68 \pm 1.67		
RF				
Negative	47 (37.6)	0.33 \pm 1.76	0.664 (-0.184-1.512)	0.123
Positive	78 (62.4)	0.78 \pm 1.65		
Anti-CCP				
Negative	54 (43.2)	0.47 \pm 1.71	-0.266 (-1.118-0.586)	0.537
Positive	71 (56.8)	0.71 \pm 1.69		
Treatment				
Methotrexate				
Nonusers	27 (21.6)	0.33 \pm 1.46	-0.331 (-1.233-0.571)	0.468
Users	98 (78.4)	0.69 \pm 1.76 (mean dose 18.09 \pm 6.26 mg/week)		
Prednisone				
Nonusers	27 (21.6)	-0.09 \pm 0.91	1.562 (0.732-2.391)	0.0003
Users	98 (78.4)	0.80 \pm 1.81 (mean dose 5.56 \pm 1.59 mg/day)		
Leflunomide				
Nonusers	74 (59.2)	0.86 \pm 1.71	-0.718 (-1.442-0.006)	0.052
Users	51 (40.8)	0.25 \pm 1.63 (mean dose 16.11 \pm 4.92 mg/day)		
Etanercept				
Nonusers	119 (95.2)	0.60 \pm 1.73	-0.475 (-1.965-1.015)	0.528
Users	6 (4.8)	0.85 \pm 0.83		
Adalimumab				
Nonusers	121 (96.8)	0.63 \pm 1.72	-0.583 (-2.488-1.322)	0.545
Users	4 (3.2)	0.03 \pm 0.72		
Chloroquine				
Nonusers	124 (99.2)	0.61 \pm 1.70	-2.565 (-5.880-0.750)	0.128
Users	1 (0.8)	-0.2		

DAS28: Disease Activity Score 28; TNF: tumor necrosis factor; SE: shared epitope; RF: rheumatoid factor; CCP: cyclic citrullinated peptide.

RA diagnosis could be of additional pathogenetic interest. Although this is the first study reporting this association, a relationship between genotypes encoding low IL-10 production and autoantibody appearance has been reported in various diseases, such as antineutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis³⁰; anti-SSA, anti-SSB, and anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus^{7,31}; antitransglutaminase antibodies in celiac disease³²; and RF in RA^{16,33}. In spite of the stimulatory effect of IL-10 on B

cells, these results could be explained in the context of an autoimmune inflammatory disease by the fact that low IL-10 levels do not allow efficient control of local inflammation, favoring tissue destruction and autoantigen exposition. Given that IL-10 and TNF- α are 2 mutually regulated cytokines that exert complex and predominantly opposite roles in inflammatory responses, it is not surprising that the strength of this association increases when the low IL-10 genotype is combined with high TNF- α production

Table 6. Association between IL-10/TNF- α genotypes and response to prednisone treatment. Association was calculated by unconditional logistic regression modeling using good response to prednisone treatment (achieving an ACR70) as the dependent variable.

Combined IL-10/ TNF- α genotype	ACR \leq 50, n = 66	ACR 70, n = 32	Univariate Analysis OR (95% CI)	p	Multivariate Analysis* OR (95% CI)	p
-1082GG+GA/-308GG (high IL-10/low TNF- α)	30 (45.5)	25 (78.1)	4.286 (1.63–11.28)	0.003	10.30 (2.73–38.84)	0.001
Other combined genotypes	36 (54.5)	7 (21.9)	1		1	

* Backward logistic regression modeling. The variables entered in the initial model were prednisone dose, other treatments used in combination with prednisone (methotrexate, leflunomide, etanercept, adalimumab), and genetic (HLA-DRB1 SE), immunologic (RF and anti-CCP antibodies), and demographic (sex and age) factors. The final model (accuracy of 77.3%) included prednisone dose, sex, and presence of anti-CCP antibodies. TNF: tumor necrosis factor; ACR: American College of Rheumatology; SE: shared epitope; RF: rheumatoid factor; CCP: cyclic citrullinated peptides.

(-308A* allele). TNF- α is a proinflammatory and proapoptotic molecule clearly involved in the pathology of RA. It is thus reasonable to assume that increased local synthesis of this cytokine, which cannot be counterbalanced by the low production of IL-10, may create a microenvironment that increases these effects, thus perpetuating autoantigen exposure and an autoimmune inflammatory response.

Nonetheless, the most relevant clinical finding of our study was a significant association between carriage of the high IL-10 producer genotype and good response to prednisone treatment, the low TNF- α genotype once more presenting a slight effect. Glucocorticoids are powerful anti-inflammatory agents and low-dose steroid treatment has been reported to play an effective role in clinical and radiographic outcomes in RA^{34,35}. Indeed, prednisone is usually given, either alone or in combination with disease-modifying antirheumatic drugs, at the start of RA. However, a significant proportion of patients fail to respond adequately to corticosteroid therapy³⁶. This association, not previously reported in patients with RA, supports the use of these genetic markers as a predictor of glucocorticoid response, as suggested by other authors. Thus, in accord with our results, carriage of the -1082 AA genotype (low IL-10 producer) has been found to be a relevant risk factor for developing steroid dependency in inflammatory bowel disease³⁷ and in pediatric heart transplant patients³⁸, while childhood acute lymphoblastic leukemia patients with the IL-10 GG genotype presented a protective effect from an initial poor response to prednisone³⁹. To explain these results, it has been proposed that the upregulation of IL-10 production may be one mechanism by means of which steroids exert their beneficial effects. Increased levels of IL-10 following steroid administration are well documented^{40,41}. In addition, it has been shown that IL-10 may increase sensitivity to glucocorticoids through upregulation of glucocorticoid receptor alpha expression, while TNF- α decreases it⁴². Moreover, IL-10 inhibits expression of the macrophage migration inhibitory factor⁴³, which is increased in patients with RA⁴⁴ and which downregulates the immunosuppressive effects of corticosteroids⁴⁵. Obviously, we cannot discard the effect of

other proposed molecular mechanisms contributing to impaired sensitivity to steroids, such as increased expression of the beta isoform of the glucocorticoid receptor⁴⁶, overexpression of the multidrug resistance gene⁴⁷, or excessive constitutive activation of the proinflammatory molecule nuclear factor- κ B⁴⁸.

Our results suggest that carriage of the low IL-10 producer genotype may protect for onset of RA; nevertheless, when other specific genetic and/or environmental factors trigger RA onset, this genotype may predispose to develop anti-CCP-positive RA disease with reduced response to treatment. Indeed, the combined low IL-10/high TNF- α genotype has also been correlated with reduced response to TNF- α blockers^{49,50}. Moreover, the presence of anti-CCP antibodies (associated with this genotype) has been related to poor prognosis and reduced response to anti-TNF- α drugs⁵¹. All these results support that RA is a heterogeneous disease that could involve different etiopathogenic factors. Thus, treatments and management of the disease might be different depending on IL-10 and TNF- α genotypes and the presence of anti-CCP antibodies.

REFERENCES

- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43:30-7.
- Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 1989;36:178-82.
- Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 2009;32:158-62.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-16.
- Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
- Suárez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutiérrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711-7.
- Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL10

- and TNFa genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605-10.
8. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
 9. Pawlik A, Kurzawski M, Szklarz BG, Herczynska M, Drozdziak M. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2005;24:480-4.
 10. Ates O, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:1243-8.
 11. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, et al. Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1093-100.
 12. Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J, et al. Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage? *Rheumatology* 2000;39:1180-8.
 13. Moreno OM, González CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martín J, et al. Polymorphisms of IL-10 gene promoter and rheumatoid arthritis in a Colombian population. *Biomedica* 2007;27:56-65.
 14. Padyukov L, Hytönen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA, et al. Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. *J Rheumatol* 2004;31:422-5.
 15. Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-a promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. *J Rheumatol* 2007;34:43-9.
 16. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998;27:142-5.
 17. Serdaroglu M, Cakirbay H, Deger O, Cengiz S, Kul S. The association of anti-CCP antibodies with disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008;28:965-70.
 18. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741-9.
 19. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004;63:1085-9.
 20. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2113-21.
 21. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1831-5.
 22. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-34.
 23. Wang J, Shete S. A test for genetic association that incorporates information about deviation from Hardy-Weinberg proportions in cases. *Am J Hum Genet* 2008;83:53-63.
 24. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:96-104.
 25. Mälärstig A, Eriksson P, Hamsten A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart* 2008;94:724-9.
 26. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;178:6092-9.
 27. Cantaert T, Kolln J, Timmer T, van der Pouw Kraan TC, Vandooren B, Thurlings RM, et al. B lymphocyte autoimmunity in rheumatoid synovitis is independent of ectopic lymphoid neogenesis. *J Immunol* 2008;181:785-94.
 28. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, et al. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1841-8.
 29. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007;56:2549-56.
 30. Castro-Santos P, Suarez A, Mozo L, Gutierrez C. Association of IL-10 and TNFa genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007;122:108-14.
 31. Schotte H, Gaubitz M, Willeke P, Tidow N, Assmann G, Domschke W, et al. Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with the anti-Sm immune response. *Rheumatology* 2004;43:1357-63.
 32. Hahn-Zoric M, Hytönen AM, Hanson LA, Nilsson LA, Padyukov L. Association of -1087 IL10 and -308 TNFA gene polymorphisms with serological markers of coeliac disease. *J Clin Immunol* 2003;23:291-6.
 33. Nemeč P, Pavkova-Goldbergova M, Gatterova J, Fojtik Z, Vasku A, Soucek M. Association of the -1082 G/A promoter polymorphism of interleukin-10 gene with the autoantibodies production in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2009;28:899-905.
 34. Svensson B, Boonen A, Albertsson K, van der Heijde D, Keller C, Hafström I. Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:3360-70.
 35. Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:3371-80.
 36. Chikanza IC, Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology* 2004;43:1337-45.
 37. Castro-Santos P, Suarez A, López-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C. TNFa and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1039-47.
 38. Zheng HX, Webber SA, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J, et al. The impact of pharmacogenomic factors on steroid dependency in pediatric heart transplant patients using logistic regression analysis. *Pediatr Transplant* 2004;8:551-7.
 39. Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 2002;16:1437-42.
 40. Gayo A, Mozo L, Suárez A, Tuñón A, Lahoz C, Gutiérrez C. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998;85:122-30.
 41. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marécaux G, Shahla M,

- Barvais L, et al. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996;119:76-80.
42. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2834-9.
43. Wu J, Cunha FQ, Liew FY, Weiser WY. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. *J Immunol* 1993;151:4325-32.
44. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 1999;42:1601-8.
45. Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* 1997;17:77-88.
46. Kozaci DL, Chernajovsky Y, Chikanza IC. The differential expression of corticosteroid receptor isoforms in corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007;46:579-85.
47. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128:288-96.
48. Bantel H, Schmitz ML, Raible A, Gregor M, Schulze-Osthoff K. Critical role of NF-kB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *FASEB J* 2002;16:1832-4.
49. Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, Ernestam S, Cederholm T, Lundkvist I, et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:526-9.
50. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-a gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF-a-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 2007;46:93-6.
51. Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Symmons DP, et al. BRAGGSS. Association of RF and anti-CCP positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-TNF response in RA. *Ann Rheum Dis* 2009;68:69-74.

4.2. Niveles de citocinas y células T reguladoras en AR y su asociación con la respuesta a los corticoides

Artículo 2: Banesa de Paz, Mercedes Alperi-López, Francisco J Ballina-García, Catuxa Prado, Carmen Gutiérrez, Ana Suárez. *Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their Relationship with Response to Corticosteroids*. The Journal of Rheumatology 10/2010; 37(12):2502-10. DOI:10.3899/jrheum.100324.

Aportación personal al trabajo: mi aportación a éste trabajo consistió en el reclutamiento de pacientes y controles, la realización de las determinaciones por citometría de flujo y expresión génica y los inmunoensayos. La preparación del manuscrito, así como el análisis y discusión de los resultados se llevaron a cabo bajo la supervisión de la Dra. Ana Suárez.

Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their Relationship with Response to Corticosteroids

BANESA de PAZ, MERCEDES ALPERI-LÓPEZ, FRANCISCO J. BALLINA-GARCÍA, CATUXA PRADO, CARMEN GUTIÉRREZ, and ANA SUÁREZ

ABSTRACT. Objective. To analyze circulating cytokines and regulatory T cells (Treg) in patients with rheumatoid arthritis (RA) of different durations, and their association with functional interleukin 10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) genotypes in patients treated with corticosteroids.

Methods. Serum levels of IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , and transforming growth factor- β (TGF- β) were quantified in 196 patients and 61 healthy controls. Percentage of CD4+CD25^{high} cells was determined by flow cytometry and Foxp3 expression by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Data were related to clinical measurements and presence of the genotype -1082GG IL-10/-308GG TNF- α , previously associated with good response to corticosteroids.

Results. Levels of TNF- α , IL-6, and IL-18 were significantly higher in patients compared to controls, while TGF- β and IL-10 were lower. Serum samples of patients at disease onset (n = 32) had increased IL-6 and decreased TGF- β , but there were no differences in other cytokines. These patients also presented a higher percentage of CD4+CD25^{high} cells than those with established disease, although no significant differences were detected in Foxp3. Patients under corticosteroid treatment who were carriers of the good responder genotype had higher levels of TGF- β , Foxp3, and Treg compared to patients with other genotypes, while relatively lower levels of TNF- α and IL-17 were observed.

Conclusion. Patients at onset of RA present fewer alterations in cytokine levels and Treg than those with longer disease duration, supporting the role of disease progression in subsequent changes. The antiinflammatory balance observed in high IL-10/low TNF- α patients treated with prednisone supports the use of these genetic polymorphisms as predictors of response to corticosteroid therapy. (J Rheumatol First Release Oct 15 2010; doi:10.3899/jrheum.100324)

Key Indexing Terms:

RHEUMATOID ARTHRITIS

CYTOKINES

REGULATORY T CELLS

CYTOKINE POLYMORPHISMS

PREDNISONE

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common autoimmune inflammatory rheumatic disorder, characterized by chronic synovitis and progressive joint destruction. Given that cytokines are important mediators in inflammation and

immune reaction, their role in RA has been extensively studied. It is well known that cytokines are highly involved in the process of the disease. A central feature of RA is an imbalance of cytokine production, with a relative excess of proinflammatory molecules, including interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-17, IL-18, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), compared with antiinflammatory mediators such as IL-10 or transforming growth factor- β (TGF- β)^{1,2,3,4,5}. The concentration of T cell-derived cytokines in peripheral blood of patients with RA, however, is low compared with synovial fluid, supporting the hypothesis of selective migration of T helper (Th)1 or Th17 effector cells into the joint, where they play a crucial role in rheumatoid synovitis.

Regulatory T cells are central in the maintenance of tolerance and immune homeostasis because they are potent suppressors and can prevent adverse immune responses. A variety of regulatory CD4⁺ T cells have been described, including adaptative regulatory T cells (Tr1 and Th3), generated in the periphery, and naturally occurring regulatory T cells (Treg), a population derived from the thymus and char-

From the Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo, and the Departments of Rheumatology and Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, PI080570) and the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT, IB08-091). B. de Paz was supported by a fellowship from FICYT and C. Prado by a fellowship from FIS.

B. de Paz, BSc; C. Prado, BSc; A. Suárez, PhD, Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo; M. Alperi-López, MD; F.J. Ballina-García, MD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario Central de Asturias; C. Gutiérrez, PhD, Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias and Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo.

Address correspondence to Dr. A. Suarez, Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain. E-mail address: anasua@uniovi.es

Accepted for publication June 7, 2010.

acterized by high constitutive expression of the IL-2 receptor α chain (CD25) and the transcription factor Foxp3. Among them, CD4+CD25highFoxp3+ cells have constituted the most widely studied population, as it is known that the reduced number or function of this subset could lead to autoimmune disorders, allergies, and organ rejection⁶. There is a consensus that synovial fluid in inflamed joints of patients with RA is enriched with Treg cells^{7,8,9}. However, normal, increased, and diminished numbers of Treg cells have been reported in the peripheral blood of patients with RA or those with other chronic rheumatic diseases^{8,9,10,11}.

After onset of RA, an important requisite for a favorable outcome is to achieve early suppression of inflammation. In clinical practice, however, a sizable proportion of patients do not successfully respond to therapies. Glucocorticoids are powerful antiinflammatory agents, and low-dose steroid treatment has been reported as effective in the achievement of clinical and radiographic outcomes in RA¹². Prednisone is usually administered, either alone or in combination with disease-modifying antirheumatic drugs, during the initiation of RA. However, a significant proportion of patients fail to respond adequately to corticosteroid therapy. The identification of genetic predictors of treatment response would thus provide valuable clinical information, because they can be determined at the time of diagnosis, when therapeutic intervention has the potential to offer the greatest benefits. The identification of poor responders prior to initiation of therapy would direct the use of alternative methods of treatment, thus preventing disease progression in these patients. We and others have reported that in patients with several diseases, the carriage of high IL-10/low TNF- α genotype could be an indicator of good response to corticosteroid therapy^{13,14,15,16}. Production of IL-10 and TNF- α , 2 mutually regulated cytokines involved in inflammatory responses, has been found to be deregulated in patients with RA^{2,3,4,5}. Since the production of these molecules is controlled at the genetic level, functional polymorphism in their promoters could influence the development and severity of the disease. Specifically, the presence of the -1082G* allele on the IL-10 gene^{17,18} and the -308A* allele at the TNF- α promoter^{19,20} were associated with the highest basal and induced cytokine production.

We analyzed cytokine and Treg levels in peripheral blood of patients with RA with different disease duration, detecting important differences between patients at diagnosis, and those with more established disease. In addition, we studied the association of circulating cytokines and Treg cells with functional IL-10 and TNF- α genotypes in patients treated with corticosteroids, supporting the use of these genetic markers as predictors of clinical response.

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls. The study group consisted of 196 patients with RA recruited from the outpatient clinic of the Hospital Central de Asturias. All

patients were diagnosed as having RA according to the American College of Rheumatology criteria²¹. Thirty-two patients were recruited at the time of diagnosis and had not been exposed to any treatment in the last 3 months, while 164 patients were previously diagnosed (median disease duration 18 months, range 2 to 61) and were treated with different drugs (prednisone, methotrexate, leflunomide, or TNF- α blockers, alone or in combination) at the time of sampling. The healthy control group consisted of 61 unrelated blood donors (40 women and 21 men; mean age 49.76 \pm 12.21 years), recruited after a medical examination. All patients and controls were of white origin. Approval for the study was obtained from the regional Ethics Committee for Clinical Investigation and all determinations were performed with fully informed written consent, the anonymity of the data being guaranteed.

Clinical and laboratory examinations. Data from physical and laboratory examinations and radiographs of the hands and feet at the time of sample collection were recovered from the arthritis diagnosis clinic database. Clinical data were as follows: age at diagnosis; duration of morning stiffness; number of swollen and tender joints; patient's global status and pain, assessed by a horizontal visual analog scale range 0–100 for global status and 0–10 for pain status; functional disability, evaluated using the Health Assessment Questionnaire (HAQ) score, ranging from 0 to 3; and the Disease Activity Score 28 (DAS28), a validated composite index that included 28 joint counts. Presence or absence of erosive damage was assessed in 125 patients by a radiologist and a rheumatologist and was defined according to the Simple Erosion Narrowing Score (SENS) method. Laboratory evaluations included presence of IgM rheumatoid factor (RF, > 20 KU/l) and anticyclic citrullinated peptide 2 (anti-CCP2) antibodies (> 25 U/ml), determined using commercial kits (IMMAGE systems, Immunochemistry Systems, Beckman Coulter, Brea, CA, USA; and IMMUNOSCAN RA Anti-CCP kit, Euro-Diagnostica AB, Mådeon, Sweden); quantification of erythrocyte sedimentation rate (ESR, mm/h) and C-reactive protein (CRP, mg/l), measured using standard laboratory methods; and the presence of at least 1 shared epitope allele (SE) on the HLA-DRB1 gene, determined in 97 patients by performing polymerase chain reactions using specific primers (Cyclerplate System Protrans HLA-DRB1*, Protrans medizinische, Hockenheim, Germany).

Determination of cytokine levels in serum. Peripheral blood was allowed to clot at least 30 min before centrifugation for 10 min at 1000 g. Aliquots of serum samples were frozen at -80°C immediately after sample collection. TNF- α and IL-18 concentration were determined by an in-house ELISA test. Microtiter wells were coated overnight with affinity-purified anti-human monoclonal antibodies (R&D Systems, Abingdon, UK) and blocked with 1% casein in Tris buffered saline (TBS) for 2 hours at 37°C. Samples and TNF- α or IL-18 standards (R&D Systems) were diluted in blocking solution and incubated for 18 hours at 4°C. After washing with TBS/Tween 20 (0.05%), wells were incubated for 2 hours with biotinylated anti-human TNF- α or IL-18 monoclonal antibodies (R&D Systems), washed, incubated for 1 hour with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and revealed using p-nitrophenyl phosphate as substrate. Absorbance was determined at a wavelength of 405 nm. Quantities of serum TNF- α and IL-18 were calculated according to the standard curves. The assay has a detection limit of 7.5 pg/ml, a within-run imprecision (coefficient of variation, CV) of < 7%, and a between-run CV < 10%. The levels of TGF- β , IL-10, IL-6, and IL-17 were determined with commercial kits (eBioscience, San Diego, CA, USA) using the ELISA technique according to the manufacturer's instructions. Detection limits for these cytokines were 11.9 ng/ml and 0.3, 0.4, and 1.5 pg/ml, respectively. Analyses of assay reproducibility showed intraassay CV for these cytokine assessments were equal to, or less than, 6.7%, 7.8%, 5.5%, and 6.4%, respectively, while interassay CV were \leq 8.5%, 10.2%, 1.4%, and 8.2%.

Flow cytometric analyses. Whole-blood cells were stained with anti-CD4-peridinin chlorophyll (PerCP) and anti-CD25-phycoerythrin (PE) or their respective isotype and fluorochrome-matched control antibodies (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). The lymphocyte population was

gated according to forward and side-scatter properties, and CD4+ cells were gated using anti-CD4 PerCP antibodies. Isotype and fluorochrome-matched controls were used to set up quadrants. The percentage of CD25high cells (mean fluorescence intensity > 25) in the total CD4+ lymphocyte population was determined after acquisition of 10,000 CD4+ lymphocytes. Analyses were performed on a FACScan flow cytometer using CellQuest software (BD-Pharmingen).

Promoter polymorphism genotyping. DNA was obtained from the peripheral blood cells of all patients (n = 196) by standard procedures. SNP at positions -1082 on the IL-10 gene and -308 on the gene encoding TNF- α were determined after amplification and hybridization with fluorescent-labeled probes (LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), as reported¹⁹. The primers used were 5'-ATC CAA GAC AAC ACT ACT AAG GC and 5'-ATG GGG TGG AAG AAG TTG AA for -1082 IL-10; and 5'-CCT GCA TCC TGT CTG GAA GTT A and 5'-CTG CAC CTT CTG TCT CGG TTT for -308 TNF- α . The hybridization probes (designed by TIB Molbiol, Berlin, Germany) were GGA TAG GAG GTC CCT TAC TTT CCT CTT ACC-F and LC Red 640-CCC TAC TTC CCC CTC CCA AA for -1082 IL-10; and AAC CCC GTC CCC ATG CCC C-F and LC Red 640-CCA AAC CTA TTG CCT CCA TTT CTT TTG GGG AC for -308 TNF- α .

Messenger RNA (mRNA) isolation and quantification. Sample mRNA (poli-A+) was isolated from whole blood using the mRNA isolation kit for blood/bone marrow (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA). Reverse transcription was carried out by standard procedures. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR; LightCycler) was used to quantify Foxp3 mRNA, monitoring the fluorescence emitted by SYBR-Green I dye using an external standard to generate a calibration curve (T cells stimulated for 48 h with platebound anti-CD3/anti-CD28 plus 500 U/ml IL-2). Since glucocorticoids and other treatments could modify the size of granulocyte or lymphocyte populations, quantification of the CD3 epsilon chain was used to normalize Foxp3 expression, leading to the determination of Foxp3/CD3 mRNA relative units. The primers used were 5'-GAA ACA GCA CTA TCC CAG AGT TC-3' and 5'-ATG GCC CAG CGG ATG AG-3' for Foxp3; and 5'-CGT TCA GTT CCC TCC TTT TCT T-3' and 5'-GAT TAG GGG GTT GGT AGG GAG TG-3' for CD3.

Statistical analyses. Results were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 15.0 for Windows. Patients were classified into 5 groups according to the duration of the disease: at diagnosis (0 months) and 1 to 11, 12 to 23, 24 to 35, or more than 35 months. As cytokine serum levels, percentage of CD4+CD25high T lymphocytes, and Foxp3 mRNA relative units were not distributed normally, nonparametric testing was used throughout (Mann-Whitney U test) and levels were described by median and interquartile range (IQR). Differences between disease measurements were performed by chi-squared test for categorical variables and Student's t-test or the Mann-Whitney U test for continuous variables. Correlations between cytokine concentrations and clinical variables were performed using Spearman's rank correlation test.

RESULTS

Cytokine profiles in patients with RA. The numbers of several proinflammatory and immunosuppressor cytokines were evaluated in the serum of healthy controls and 2 groups of patients with RA, at diagnosis and with established disease. Demographic and clinical details of patients are given in Table 1, which shows worse disease measurements in patients recently diagnosed and without any treatment. Table 2 shows that levels of TNF- α , IL-6, and IL-18 were significantly higher in the whole population of patients with RA as compared to controls, while TGF- β and IL-10 concentrations were lower in the patient group. However,

serum samples of patients at diagnosis had increased IL-6 and decreased TGF- β , but there were no significant differences in TNF- α , IL-18, or IL-10 levels.

In view of these results, we analyzed cytokine levels of patients with RA categorized in 5 groups according to the duration of the disease (Figure 1A). IL-18 and TNF- α levels were higher in patients with longer disease duration compared with patients at the time of diagnosis. Conversely, IL-10 and IL-6 concentrations were diminished, in parallel to DAS28 activity (Figure 1B) and probably related to efficient response to treatment. A similar trend was observed when patients were stratified according to the treatment received (data not shown). Moreover, no significant differences in cytokine levels were detected between users and nonusers of methotrexate, prednisone, or leflunomide. In line with previous reports, however, increased TNF- α levels were observed in patients with anti-TNF- α therapy (106.74 ng/ml with anti-TNF- α therapy vs 39.80 ng/ml without anti-TNF- α therapy; p = 0.003). Nevertheless, after analyzing the proportions of users of each treatment in the different subgroups, we noted an effect of patient therapy (Figure 1C). No significant differences were detected in the percentage of patients receiving methotrexate, but leflunomide users were increased in the group of patients with more than 2 years of disease duration, and patients treated with glucocorticoids decreased 3 years after diagnosis. A uniform distribution of TNF- α blockers was detected in patients since the first year.

Finally, evaluation of clinical features showed that IL-6 levels were positively correlated with DAS28 (r = 0.249, p = 0.001), ESR (r = 0.374, p < 0.001), CRP (r = 0.627, p < 0.001), RF (r = 0.164, p = 0.022), and anti-CCP antibodies (r = 0.191, p = 0.007), while TNF- α levels correlated with erosive disease (r = 0.178, p = 0.046), RF (r = 0.253, p < 0.001), and anti-CCP antibodies (r = 0.326, p < 0.001). In contrast, TGF- β levels were negatively correlated with the number of tender and swollen joints (r = -0.203, p = 0.011, and r = -0.179, p = 0.025, respectively). Interestingly, disease duration was positively correlated with levels of TGF- β (r = 0.190, p = 0.003) and IL-18 (r = 0.224, p = 0.004), while it correlated negatively with IL-6 (r = -0.269, p < 0.001) and most clinical measurements: DAS28 (r = -0.512, p < 0.001), CRP (r = -0.194, p = 0.016), patient's global assessment (r = -0.517, p < 0.001), HAQ (r = -0.356, p < 0.001), duration of morning stiffness (r = -0.357, p < 0.001), patient's assessment of pain (r = -0.378, p < 0.001), and the number of tender (r = -0.506, p < 0.001) and swollen (r = -0.535, p < 0.001) joints.

Treg population and Foxp3 levels. To analyze Treg population in patients with RA, we determined the percentage of CD4+CD25high cells and the expression of Foxp3 gene. Figure 2 shows that patients at diagnosis presented a higher percentage of CD4+CD25high cells than those with established disease (8.15% vs 6.47%; p = 0.027). No significant

Table 1. Demographic and clinical features of patients with rheumatoid arthritis. Values are the mean \pm SD except for disease duration, which are median (range), and presence of RF, anti-CCP, erosive disease, HLA-DRB1 SE, and different drug treatments, which are n (%).

Features	Patients at Diagnosis, n = 32	Patients with Established Disease, n = 164
Age at diagnosis, yrs	54.23 \pm 16.19	56.15 \pm 14.72
Men/women	9/23	46/118
DAS28	5.93 \pm 0.94	3.34 \pm 1.36**
Number of swollen joints	7.31 \pm 3.54	1.63 \pm 1.95**
Number of tender joints	12.41 \pm 5.39	3.59 \pm 4.59**
Duration of morning stiffness, min	107.96 \pm 97.56	22.74 \pm 42.55**
Patient global assessment	58.86 \pm 22.79	25.08 \pm 21.59**
Patient assessment of pain	5.89 \pm 2.36	2.56 \pm 2.36**
HAQ	1.42 \pm 0.68	0.60 \pm 0.57**
CRP, mg/dl	2.39 \pm 3.00	0.66 \pm 0.92*
ESR, mm/h	37.94 \pm 24.38	29.32 \pm 19.39
Presence OF HLA-DRB1 SE	18 (62.1)	79 (52.0)
RF positivity	18 (56.3)	100 (60.4)
Anti-CCP positivity	15 (46.9)	99 (59.3)
Erosive disease	3 (18.8)	35 (32.1)
Disease duration, mo (range)		18 (2–61)
Treatment		
Methotrexate		128 (81.0)
Prednisone		123 (77.8)
Leflunomide		59 (37.3)
Etanercept		13 (8.2)
Adalimumab		6 (3.8)
Chloroquine		1 (0.6)
Sulfasalazine		1 (0.6)

Differences between patient groups were evaluated using the chi-square test for categorical variables and Student's t-test or the Mann-Whitney U test for continuous variables. * p = 0.004; ** p < 0.0001. RF: rheumatoid factor; CCP: cyclic citrullinated peptide; DAS28: 28-joint-count Disease Activity Score; HAQ: Health Assessment Questionnaire; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate.

Table 2. Cytokine serum levels in healthy controls and patients with rheumatoid arthritis (RA). Values are the median (interquartile range, IQR) of the serum concentration of TNF- α , IL-6, IL-18, IL-17, and IL-10 (pg/ml), and TGF- β (ng/ml).

Cytokines	Controls		All Patients		Patients at Diagnosis	
	n	Median (IR)	n	Median (IR)	n	Median (IR)
TNF- α	61	23.16 (100.01)	196	47.33 (136.87)**	32	28.37 (51.58)
IL-6	59	0.77 (0.96)	196	1.90 (4.69)***	32	3.54 (1.7)***
IL-18	24	436.00 (254.50)	167	607.00 (496.00)*	23	486.32 (302.96)
IL-17	29	1.44 (1.92)	196	1.68 (1.48)	32	1.63 (0.52)
TGF- β	52	46.31 (17.24)	196	37.93 (29.72)**	32	33.45 (11.26)**
IL-10	50	0.75 (1.05)	196	0.38 (0.80)***	32	0.71 (0.39)

Differences between controls and all patients with RA or patients at diagnosis were evaluated by Mann-Whitney U test. * p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.001. TNF: tumor necrosis factor; TGF: transforming growth factor.

differences, however, were detected in Foxp3 mRNA levels. Although it has been suggested that glucocorticoids increase Treg cell and Foxp3 expression, no significant differences were found between patients with RA receiving therapy with prednisone and those not receiving it [median (IQR), Treg: 6.57% (3.58) vs 7.07% (4.01); Foxp3: 0.38 (1.28) vs 0.34 (1.10)], nor did we observe significant differences between patients taking methotrexate [Treg: 6.51% (3.64) vs

7.30% (4.08); Foxp3: 0.41 (1.28) vs 0.33 (0.93)], leflunomide [Treg: 6.71% (3.88) vs 6.59% (4.18); Foxp3: 0.38 (1.10) vs 0.36 (1.24)], or TNF- α blockers [Treg: 6.84% (3.93) vs 6.67% (3.83); Foxp3: 0.49 (1.24) vs 0.35 (1.20)]. *TNF- α /IL-10 polymorphisms influence cytokine and Treg levels in steroid-treated patients.* We have reported an association between IL-10 and TNF- α genetic polymorphisms and clinical response to glucocorticoids in patients with

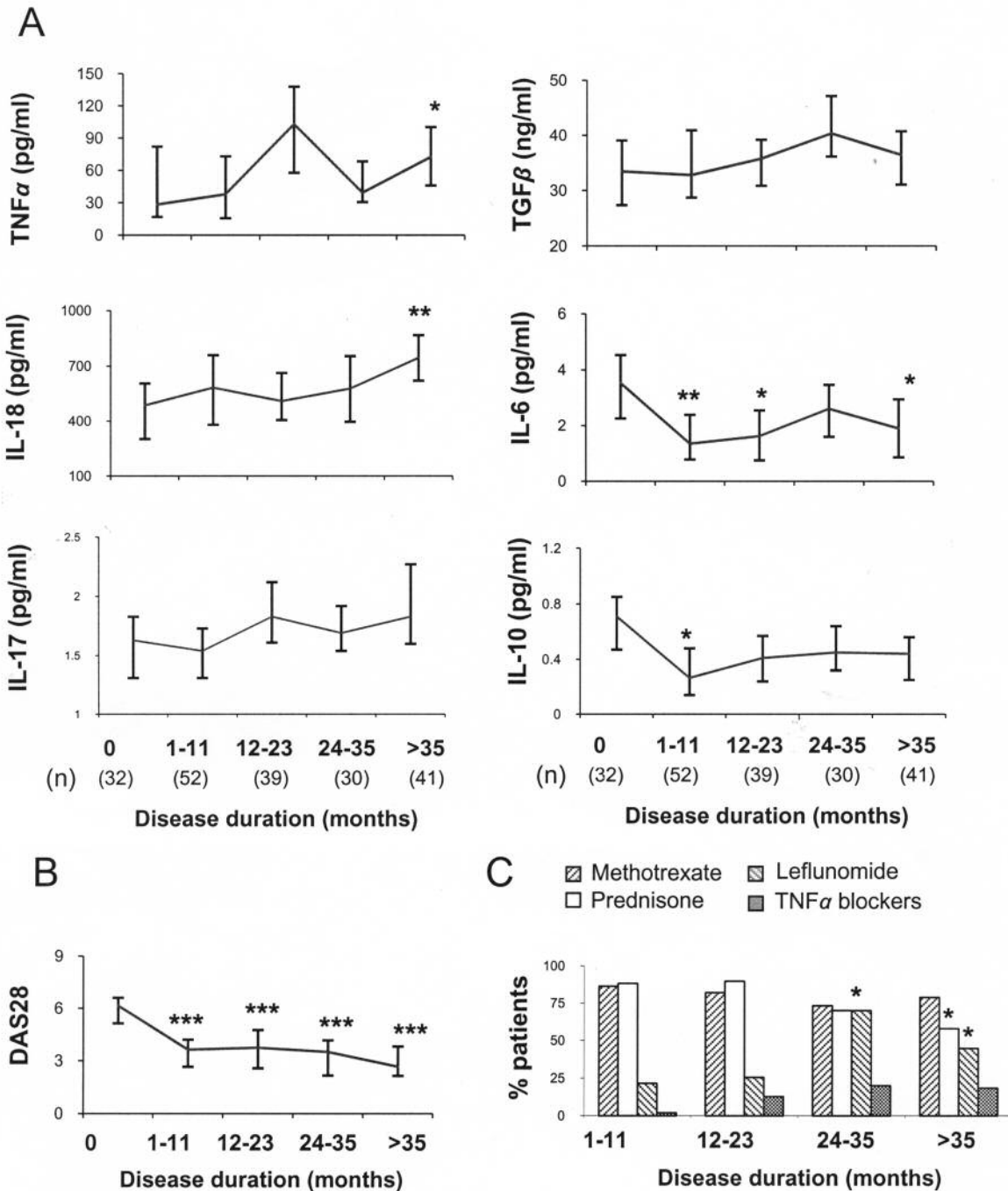


Figure 1. Circulating cytokines in patients with RA with different disease durations. Patients were categorized into 5 groups according to disease duration, and serum cytokine levels were quantified by ELISA. (A) Median and interquartile range. (B) DAS28 scores of RA subgroups. (C) Percentages of patients receiving methotrexate, prednisone, leflunomide, and TNF- α blockers in each group of patients with RA. The number of circulating cytokines present in patients at diagnosis (disease duration = 0) were compared with levels in patients with different disease duration by the Mann-Whitney U test. Differences between treatments were evaluated by chi-square test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

RA¹⁶. Thus, we wondered whether carriage of the putative good-responder genotype (high IL-10/low TNF- α) was associated with quantitative differences in cytokine levels and/or Treg cells. To this end, patients with RA were genotyped for -1082 IL-10 and -308 TNF- α positions and clas-

sified into 2 groups according to the carriage of the combined IL-10GG/TNF- α GG genotype, suggestive of the best response to glucocorticoid therapy. Figure 3 shows that, among prednisone-treated patients, carriers of the high IL-10/low TNF- α genotype presented higher levels of

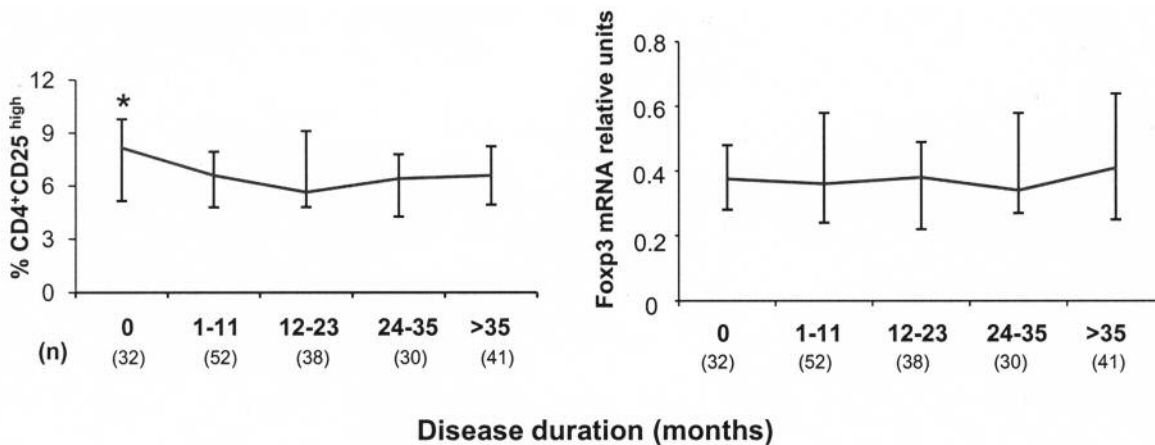


Figure 2. Treg cells and Foxp3 expression in patients with RA with different disease duration. The percentage of CD25^{high} cells of the total CD4⁺ lymphocyte subset was determined in 196 patients with RA after flow cytometric analysis of 10,000 CD4⁺ lymphocytes. Foxp3 expression was quantified by RT-PCR and normalized to CD3 gene after mRNA (poly-A⁺) extraction from whole-blood samples. Differences between patients at diagnosis (disease duration = 0) and those with established disease were evaluated by the Mann-Whitney U test. *p < 0.05.

Foxp3, Treg cells, and TGF- β than those with other genotypes, while the balance between the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-17 and the immunosuppressor TGF- β showed an opposite result. No significant differences in cytokine levels or Treg cells related to genotype were observed among patients without prednisone treatment.

DISCUSSION

Many cytokines have been found to be altered in patients with RA, suggesting that they may contribute to the pathogenesis of the disease^{1,2,3,4,5,22,23}. However, most investigations analyze patients with long disease duration and thus cytokine changes could be the result of persistent inflammatory status or, indeed, a consequence of treatment. In this study we analyzed serum samples of patients with RA at the time of diagnosis and without any treatment, finding significantly higher levels of IL-6 and lower levels of TGF- β , compared with healthy controls. The analysis of patients with previous diagnosis of RA showed that TNF- α and IL-18 levels increased while IL-10 and IL-6 diminished in patients with longer disease duration. Indeed, analyzing the entire RA group, we found upregulated levels of TNF- α , IL-18, and IL-6, and lower levels of TGF- β and IL-10, in agreement with results reported by other authors.

High levels of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-18, and IL-6 have been widely reported in patients with RA^{4,24,25}. Overproduction of TNF- α has been found to be associated with joint destruction^{3,26}. In this regard, evidence supports a pivotal role of TNF- α as a potent paracrine cytokine that may be able to induce the release of other proinflammatory molecules in joints²⁷. Our data, however, did not show high significant levels of TNF- α at the time of diagnosis, suggesting that their later increase could be related to the maintenance of an inflammatory situation. We also found that high TNF- α levels were associated with erosive disease, in

accord with previous findings^{3,26}, and with the presence of RF and anti-CCP antibodies. Thus, early anti-TNF- α therapy, especially in patients with a genotype suggestive of favorable response²⁸, would prevent joint destruction and disease progression. Similarly to TNF- α , we found high IL-18 levels in patients with established disease. Elevated levels of this molecule have been reported in the serum and synovial fluid of patients with RA^{4,25,29}, suggesting their role during the chronic inflammatory phase of the disease²⁹.

On the other hand, IL-6 levels were increased above normal concentrations in the whole patient group, although the highest amounts were observed at disease onset, and declined in parallel with disease activity, probably because of treatment response. In accord with our results, high levels of IL-6 have been widely reported in serum and synovial tissue of patients with RA^{30,31}. In addition, IL-6 levels in our patient group were highly correlated with DAS28, ESR, and CRP, all markers of disease activity, as well as with the presence of RF and anti-CCP antibodies. In other studies, associations with surrogate markers of disease activity, including RF, ESR, and CRP^{20,32,33}, and with clinical manifestations³¹ have also been reported. The downregulation of IL-6 along with disease duration that we observed in our patient group, which correlated strikingly with disease activity, suggests that circulating IL-6 levels may be a primary marker for treatment response and/or control of clinical disease measurements.

Growing evidence supports the involvement of IL-17 in this disease; however, we did not find significant differences in levels of this cytokine between patients and controls. Increased levels of IL-17 have been described in the synovial fluid of patients with RA, where it could be involved in joint destruction³⁴. However, no definitive results showing increased circulating levels of this cytokine have been reported^{35,36,37}. The other analyzed cytokines, IL-10 and TGF- β , function mainly as antiinflammatory molecules.

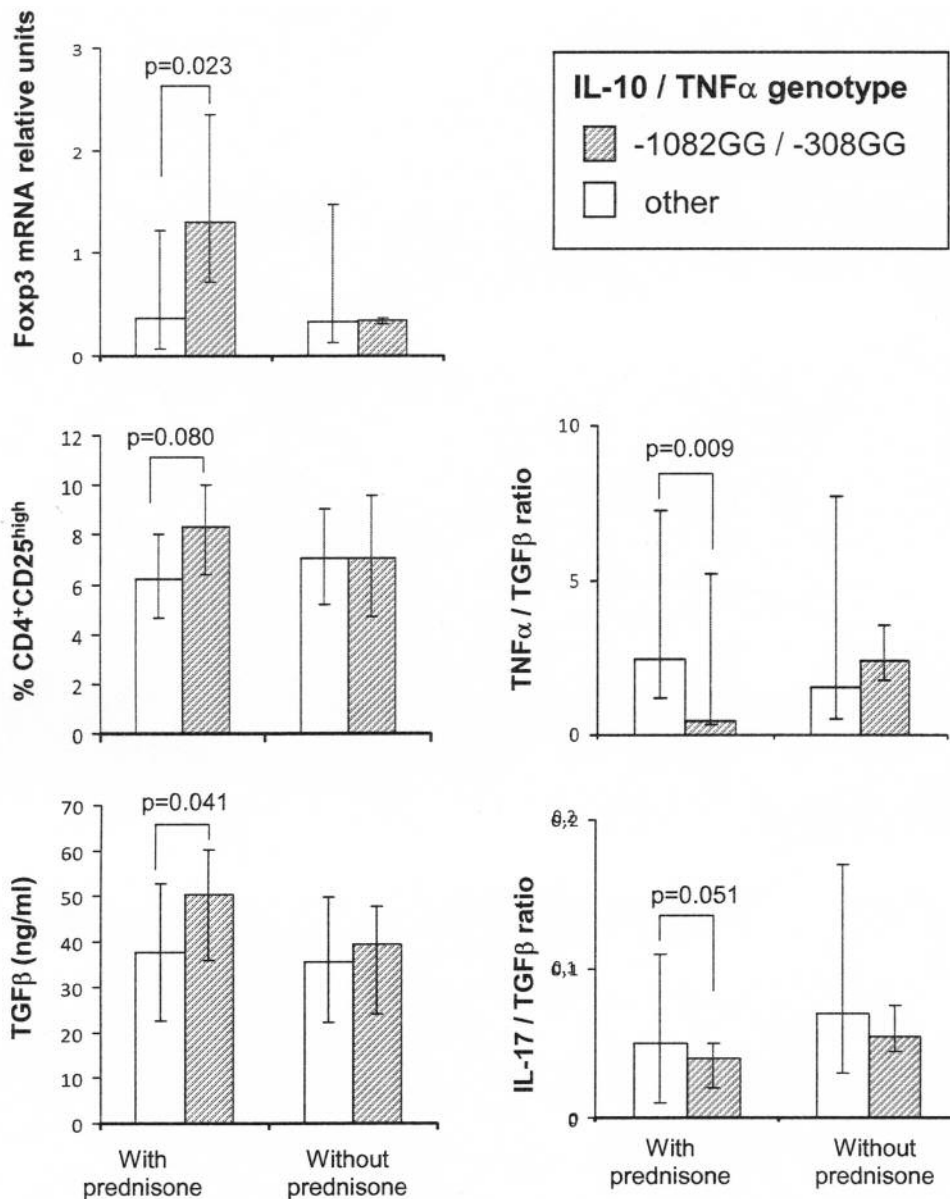


Figure 3. TNF- α /IL-10 polymorphisms influence cytokine balance and Fcpx3 expression in steroid-treated patients. Patients with RA were classified as users or nonusers of prednisone. Alleles present at positions -1082 of IL-10 and -308 of TNF- α genes were determined after amplification and hybridization with allele-specific fluorescent-labeled probes. Differences between high IL-10/low TNF- α patients (-1082GG/-308GG genotype) and carriers of other genotypes were assessed by Mann-Whitney U test.

IL-10 is a potent inhibitor of the production of proinflammatory mediators by macrophages, and was considered to mediate potent downregulation of the proinflammatory response in RA^{38,39}. However, previous reports on IL-10 in this disease are contradictory, and both elevated and reduced levels have been reported^{2,40,41}. In the same way, TGF- β is well known for its immune-suppressive and antiinflammatory properties, being able to modulate the expression of inflammatory molecules⁴². In accord with our results, decreased serum levels of TGF- β were reported in patients

with RA compared to healthy controls²⁵, although other authors did not find significant differences⁴³. It is thus reasonable to assume that the diminution of antiinflammatory cytokines, such as TGF- β and IL-10, may reflect an insufficient antiinflammatory control of the disease.

Analysis of the frequency of peripheral blood CD4⁺CD25^{high} Treg cells in patients with RA has yielded contradictory results. Although some have reported an increased frequency of this cell population⁹, others have demonstrated either no difference or decreased levels com-

pared to healthy donors^{8,10,11}. Our results suggest that these discrepancies could be due, at least in part, to patient selection, because the percentages of CD4+CD25^{high} cells are significantly lower in patients several months after diagnosis than at the onset of the disease. Curiously, IL-10, an immunosuppressor cytokine, shows the same tendency, opposite to that of TNF- α . Thus, we can hypothesize that diminished amounts of Treg and IL-10, in addition to the constantly low TGF- β levels, could contribute to the absence of control of inflammation in patients with established disease.

Glucocorticoids are powerful antiinflammatory agents and low-dose steroid treatment has been reported to play an effective role in the achievement of clinical and radiographic outcomes in RA¹². However, a significant proportion of patients fail to respond adequately to this therapy. Thus, the identification of validated tools that can predict whether a patient with RA will respond poorly to corticoid therapy would direct the use of alternative methods of treatment, thereby preventing disease progression in these patients. Given the evident advantages of the use of genetic markers, a number of works have studied the role of functional polymorphisms in the promoter of IL-10 and TNF- α genes to predict the risk of disease appearance and outcome. In this regard, it has been reported that carriage of high IL-10/low TNF- α genotype would be an indicator of good response to corticosteroids in patients with several diseases, including RA^{13,14,15,16}. We examined cytokine levels, Treg cells, and Foxp3 mRNA expression in the peripheral blood of patients with RA, both users and nonusers of glucocorticoid therapy. Our results indicated that corticosteroid-treated patients who were carriers of the good-responder genotype (high IL-10/low TNF- α) had higher levels of the immunosuppressor mediators TGF- β , Foxp3, and Treg cells, and relatively low levels of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-17 than patients with other genotypes.

TGF- β is a key signaling factor for Foxp3 expression, indispensable for induced Treg cell differentiation and function⁴⁴. Indeed, in our patient group, a significant positive correlation was observed between the amounts of TGF- β and Foxp3 ($n = 191$, $r = 0.166$, $p = 0.02$). Therefore, the high TGF- β levels produced by corticoid-treated patients who were carriers of the high IL-10/low TNF- α genotype suggest that the enrichment of CD4+CD25^{high} T cells in this patient group could be as a consequence of TGF- β -induced Foxp3 upregulation. All these data support the influence of IL-10 and TNF- α polymorphisms on glucocorticoid response and could explain part of the beneficial effects of this therapy for patients with high IL-10/low TNF- α genotype. Increased CD4+CD25^{high} lymphocytes and Foxp3 expression have been reported in patients with systemic lupus erythematosus treated with corticoids^{45,46}. However, in our group of patients with RA, we found this beneficial effect only in carriers of the high IL-10/low TNF- α geno-

type. This discrepancy could also be due to differences in the dosage of corticoids, since patients with RA received a low prednisone dose (mean \pm SD, 5.53 ± 1.54 mg/day), while the effect on SLE was reported in patients treated with > 5 mg/day of this drug⁴⁵.

Our study shows that at the onset of the disease, in spite of their high disease activity and worse clinical measurements compared to patients with longer disease duration, patients with RA do not present many alterations in circulating cytokines and regulatory T cell numbers. This suggests that chronic inflammation, disease progression, or treatment outcome may be the origin of the most important imbalance of immunological mediators observed in patients with established disease. However, a prospective longitudinal study must be performed to confirm this hypothesis. On the other hand, the relatively low amounts of inflammatory mediators as well as the elevated levels of Foxp3 and Treg cells observed in high IL-10/low TNF- α patients under prednisone treatment support the use of these genetic polymorphisms as predictors of response to corticoid therapy.

REFERENCES

1. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307-10.
2. Lapadula G, Iannone F, Dell'Accio F, Covelli M, Pipitone V. Interleukin-10 in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:629-32.
3. Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 2006;6:13-9.
4. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12, and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006;25:448-52.
5. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AM, Hassan HI, Abdullah F, Al-Hakeem E, et al. Alterations of the CD4(+), CD8(+) T cell subsets, interleukins-1 beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol Oncol Res* 2008;14:321-8.
6. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:227-35.
7. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R335-46.
8. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:360-7.
9. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004;50:2775-85.
10. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-85.
11. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a

- deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology* 2006;45:1210-7.
12. Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:3371-80.
 13. Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumor necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 2002;16:1437-42.
 14. Zheng HX, Webber SA, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J, et al. The impact of pharmacogenomic factors on steroid dependency in pediatric heart transplant patients using logistic regression analysis. *Pediatr Transplant* 2004;8:551-7.
 15. Castro-Santos P, Suarez A, Lopez-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C. TNF alpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1039-47.
 16. de Paz B, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Prado C, Mozo L, Gutiérrez C, et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor- α genotypes in rheumatoid arthritis — association with clinical response to glucocorticoids. *J Rheumatol* 2010;37:503-11.
 17. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711-7.
 18. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
 19. Suarez A, Lopez P, Mozo L, Gutierrez C. Differential effect of IL10 and TNF alpha genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605-10.
 20. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
 21. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
 22. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008;118:3537-45.
 23. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
 24. Chen DY, Hsieh TY, Chen YM, Hsieh CW, Lan JL, Lin FJ. Proinflammatory cytokine profiles of patients with elderly-onset rheumatoid arthritis: a comparison with younger-onset disease. *Gerontology* 2009;55:250-8.
 25. Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007;36:96-9.
 26. Neidel J, Schulze M, Lindschau J. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1995;44:217-21.
 27. Dai SM, Shan ZZ, Xu H, Nishioka K. Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1411-8.
 28. Seitz M, Wirthmuller U, Moller B, Villiger PM. The -308 tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF alpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology* 2007;46:93-6.
 29. Dayer JM. Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. *J Clin Invest* 1999;104:1337-9.
 30. Lettesjö H, Nordström E, Ström H, Nilsson B, Glinghammar B, Dahlstedt L, et al. Synovial fluid cytokines in patients with rheumatoid arthritis or other arthritic lesions. *Scand J Immunol* 1998;48:286-92.
 31. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:232-4.
 32. Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G. Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992;19:22-5.
 33. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007;56:2549-56.
 34. Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000;12:1092-9.
 35. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Rheumatol* 2008;35:515-9.
 36. Singh R, Aggarwal A, Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis. *J Rheumatol* 2007;34:2285-90.
 37. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000;164:2832-8.
 38. Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1996;39:386-95.
 39. Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-90.
 40. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:96-104.
 41. Lacki JK, Samborski W, Mackiewicz SH. Interleukin-10 and interleukin-6 in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, correlations with acute phase proteins. *Clin Rheumatol* 1997;16:275-8.
 42. Wahl SM, Allen JB, Wong HL, Dougherty SF, Ellingsworth LR. Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor-beta and IL-1 in rheumatoid synovium. *J Immunol* 1990;145:2514-9.
 43. Eriksson P, Andersson C, Ekerfelt C, Ernerudh J, Skogh T. Relationship between serum levels of IL-18 and IgG1 in patients with primary Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and healthy controls. *Clin Exp Immunol* 2004;137:617-20.
 44. Klunker S, Chong MM, Mantel PY, Palomares O, Bassin C, Ziegler M, et al. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 2009;206:2701-15.
 45. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1512-7.
 46. Lopez P, Gomez J, Prado C, Gutierrez C, Suarez A. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-alpha polymorphisms on interferon-alpha, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment. *J Rheumatol* 2008;35:1559-66.

4.3. Efecto del tratamiento sobre la expresión de Foxp3 y las células productoras de citocinas.

Artículo 3: Banesa de Paz , Catuxa Prado , Mercedes Alperi-López , Francisco J Ballina-García , Javier Rodriguez-Carrio , Patricia López, Ana Suárez. *Effects of glucocorticoid treatment on CD25(-)FOXP3(+) population and cytokine-producing cells in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford, England) 03/2012; 51(7):1198-207. DOI:10.1093/rheumatology/kes039

Aportación personal al trabajo: En colaboración con los coautores del trabajo llevé a cabo la recolección de las muestras y datos de los pacientes. Mi labor principal se centró en la realización de los análisis genéticos y las determinaciones por citometría de flujo. Por último, trabajé en la redacción del manuscrito y la confección de las figuras que lo acompañan bajo la supervisión de la Dra. Ana Suárez Díaz.

Original article

Effects of glucocorticoid treatment on CD25⁻FOXP3⁺ population and cytokine-producing cells in rheumatoid arthritis**Banesa de Paz¹, Catuxa Prado¹, Mercedes Alperi-López²,
Francisco J. Ballina-García², Javier Rodríguez-Carrio¹,
Patricia López¹ and Ana Suárez¹****Abstract**

Objectives. To investigate CD25⁻FOXP3⁺ cells in RA patients and their possible relationship with disease features and response to glucocorticoids (GCs).

Methods. Peripheral blood mononuclear cells were collected from 147 RA patients, 29 healthy controls and 75 SLE patients as disease controls. The proportion of CD4⁺FOXP3⁺ cells with negative, low or high CD25 expression and the levels of IL-10-, TNF- α -, IL-17- and IFN- γ -producing cells were assessed by flow cytometry. The presence of the high IL-10 genotype (-1082GG), associated with good response to GC, was determined by PCR amplification and hybridization with allele-specific fluorescently labelled probes. Data were related to treatment and clinical parameters.

Results. The CD25⁻FOXP3⁺ population was significantly increased in RA patients and negatively correlated with DAS-28 and other disease parameters. The IL-10 genotype did not influence the frequency of these cells in controls or the entire RA group; however, GC-treated patient carriers of the high IL-10 genotype presented significantly higher levels of this population in addition to an increased percentage of IL-10-secreting cells and relatively low amounts of TNF- α -, IFN- γ - and IL-17-positive cells. Finally, a prospective study confirmed that genetically high IL-10 producers significantly increase CD25⁻FOXP3⁺ cells after 6 months of GC treatment.

Conclusion. The present study provides the first evidence of increased CD25⁻FOXP3⁺ cells in RA patients, which were associated with disease activity and with GC treatment in carriers of the high IL-10 genotype, suggesting that this population plays a role in the clinical response to prednisone in RA.

Key words: rheumatoid arthritis, CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ population, IL-10 cytokine polymorphism, cytokine-producing cells, corticosteroid treatment.

Introduction

RA is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by joint inflammation resulting in cartilage and bone damage, and eventually leading to joint destruction. Several different cells types and their mediators are

involved in the destructive inflammation of tissue, including T and B cells, monocyte/macrophages and pro-inflammatory cytokines.

The identification of T cell subsets with regulatory functions has opened up a vast field of research into the potential roles of these populations in controlling RA. A variety of regulatory CD4⁺ T cells have been described, including the naturally arising CD25^{high}FOXP3⁺ cells (nTreg) as well as Tr1 (IL-10-secreting), Th3 (TGF- β -secreting) and induced Treg (iTreg, CD25^{high}FOXP3⁺) cells, generated in the periphery. Among these, CD25^{high}FOXP3⁺ cells are considered to be important regulators of immune homeostasis and tolerance perpetuation. Classically, Treg cells are derived from the thymus and

¹Department of Functional Biology, Immunology Area, University of Oviedo and ²Department of Rheumatology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

Submitted 9 September 2011; revised version accepted 1 February 2012.

Correspondence to: Ana Suárez, Facultad de Medicina, Departamento de Biología Funcional, Área de Inmunología, University of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: anasua@uniovi.es

characterized by high expression of CD25, the IL-2 receptor α chain and FOXP3, a member of the forkhead box family of transcription factors. However, it is well known that this transcription factor is also expressed in peripherally induced Treg [1] and even in human-activated T cells without suppressive activity [2]. Moreover, a subpopulation of FOXP3⁺ CD4⁺ cells lacking CD25 expression has recently been reported to be augmented in the peripheral blood of lupus patients [3–6]. Nevertheless, the function, origin and clinical significance of this subpopulation as yet remain unknown. Besides CD25 and FOXP3, other surface markers like CD127^{-/low} have been commonly used to identify Treg population [7], although this molecule is also down-regulated after activation [8].

The intracellular marker FOXP3 is a critical transcription factor for the development and function of regulatory lymphocytes and thus appears to be of great significance for both the identification and activity of natural and induced Treg cells. In fact, retroviral transduction of FOXP3 in CD4⁺CD25⁻ lymphocytes phenotypically and functionally converts them into Treg-like cells capable of suppressing both T-cell proliferation *in vitro* and the development of inflammatory autoimmune diseases *in vivo* [9, 10]. Moreover, decreased FOXP3 expression enhances autoimmune responses by subverting the suppressive function of Tregs, converting them into effector cells [11, 12]. Thus expression of FOXP3 seems to play a key role in confirming and governing regulatory T-cell action.

Treg cells have been identified in the peripheral blood and synovial tissue of patients with RA [13–15] and it has been suggested that quantitative or qualitative alterations in Treg cells may contribute to the development and continuance of the disease. There is consensus that SF in inflamed joints of RA patients is enriched in CD25^{high} FOXP3⁺ cells [13, 15, 16]. However, normal, increased and diminished numbers of circulating Treg cells have been reported in patients with RA and other chronic rheumatic diseases [14–17]. These discrepancies could probably be ascribed to differences in patient selection or in Treg definition. Nothing is known, however, about the small population of FOXP3⁺ cells lacking CD25 expression in RA.

It has been reported that medium/high glucocorticoid (GC) doses increased CD4⁺CD25^{high} lymphocytes and FOXP3 expression in patients with several diseases [18–21]. The potential disease-modifying role of low-to-medium doses of GC in RA has been reconfirmed in the past decade, and co-administration of DMARDs and GC has become standard in many treatment protocols, especially those for early disease stages, where it has been reported to play an effective role in clinical and radiological progression [22]. However, a number of RA patients fail to respond to the therapeutic effect of this medication. Several studies have shown the importance of genetically determined differences in cytokine production for RA phenotype and response to treatments. In this regard, we and other authors have shown that carriage of the -1082GG genotype on the IL-10 gene, associated with the highest basal and induced cytokine production,

would be an indicator of good response to GC in patients with RA and other diseases [23–28].

In the present study we investigated the CD4⁺FOXP3⁺ population lacking CD25 expression in RA patients, its association with clinical parameters and its possible relationship with response to GC in patients who are genetically good responders to this treatment.

Materials and methods

Patients and controls

The study group consisted of 147 RA patients consecutively recruited from the Early Arthritis Diagnosis outpatient clinic of the Hospital Central de Asturias, 29 sex- and age-matched healthy blood donors [25 women and 4 men; mean age (s.d.) 44.6 (12.2)], and 75 SLE patients [72 women and 3 men; mean age (s.d.) 47.6 (16.9)] as disease controls. To perform a prospective study, 15 untreated RA patients were recruited at the time of diagnosis and followed over time. The 1987 revised criteria of the ACR were used for the diagnosis of RA and the 1997 revised ACR classification criteria for SLE. Approval for the study was obtained from the regional Ethics Committee for Clinical Investigation and all determinations were performed with fully informed written consent.

Clinical and laboratory examinations

Data from physical and laboratory examinations at the time of sample collection were recovered from the Early Arthritis Diagnosis clinic database for RA patients. Clinical data were as follows: age at diagnosis; duration of morning stiffness; number of swollen and tender joints; patient's global status and pain, assessed by a horizontal visual analogue scale ranging from 0 to 100 for global status and from 0 to 10 for pain status; functional disability, evaluated using the HAQ score, ranging from 0 to 3; and DAS-28, a validated composite index that included 28 joint counts. Laboratory evaluations included the presence of IgM RF (>20 KU/l) and anti-CCP2 antibodies (>25 U/ml), determined using commercially available kits (IMMAGE systems, Immunochemistry systems, Bekman Coulter; and IMMUNOSCAN RA Anti-CCP kit, Euro-Diagnostica AB, Madeon, Sweden, respectively) and quantification of ESR (mm/h) and CRP (mg/l), measured using standard laboratory methods. In the prospective study to ascertain clinical response to GC treatment, DAS-28 was also determined after 3 and 6 months, calculating the absolute change in DAS-28 (Δ DAS-28) as a measure of treatment effectiveness.

Phenotypic analysis of CD4⁺ T cells

Expression of Treg markers on CD4⁺ T cells from patients and controls were determined immediately after blood collection by multi-parametric flow cytometry. Blood samples were first extracellularly stained with anti-CD4 allophycocyanin (APC), anti-CD25 FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) and anti-CD127 PE-Cy7. Cells were then fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-FOXP3 phycoerythrin (PE) (clone PCH101) following

the manufacturer's instructions for whole blood samples (Human FOXP3 staining kit; eBioscience, San Diego, CA, USA). The lymphocyte population was gated according to forward and side-scattered properties and CD4⁺ T cells were selected using anti-CD4 antibodies. Isotype controls were used to set up the CD25-negative population and CD4⁺CD25⁺ T cells were subdivided into CD25^{low} and CD25^{high} populations according to the intensity of CD25 expression. These three cellular subsets were further characterized by multi-parametric phenotypic analysis after acquiring 10 000 CD4⁺ lymphocytes. Analyses were carried out on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen) using FACSDiva Software 6.1.2 (BD Pharmingen).

Promoter polymorphism genotyping

DNA was obtained from the peripheral blood cells of 134 RA patients and 25 healthy controls (HCs) by standard procedures. Single nucleotide polymorphism at position -1082 on the IL-10 gene was determined after amplification and hybridization with fluorescent-labelled probes (LightCycler, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), as previously reported [7]. The primers used were 5'-ATC CAA GAC AAC ACT ACT AAG GC-3' and 5'-ATG GGG TGG AAG AAG TTG AA-3'. The hybridization probes (designed by TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) were GGA TAG GAG GTC CCT TAC TTT CCT CTT ACC-F and LC Red 640-CCC TAC TTC CCC CTC CCA AA.

Production of intracellular cytokines

Intracellular accumulation of cytokines was evaluated at the single-cell level by flow cytometry after stimulation of isolated cells in the presence of a Golgi inhibitor. To this end, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from heparinized blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and resuspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium (Invitrogen, UK) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Hyclone, USA), penicillin (20 U/ml) and streptomycin (20 µg/ml). Isolated PBMCs were stimulated with 20 ng/ml of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and 500 ng/ml of ionomycin in the presence of 2 µM of monensin (all from Sigma Aldrich, Germany) for 5 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were subsequently washed twice with PBS plus 3% FCS and stained with anti-CD4 APC (BD Pharmingen). Cells were then fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-IL-10 PE (BD Pharmingen) and anti-TNF-α PerCP-Cy5.5 (eBioscience) or with anti-IL-17 PE and anti-IFN-γ PerCP-Cy5.5 (from eBioscience). Fixation and permeabilization were carried out using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Pharmingen) following the manufacturer's recommendations. The corresponding isotype- and fluorochrome-matched controls were used to set up quadrants. A minimum of 10 000 CD4⁺ T lymphocytes were acquired and analysed (BD FACSCanto II). Results are expressed as the percentage of positive cells.

Statistical analysis

Values are shown throughout the article as median and interquartile range. The Mann-Whitney U-test or the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison post-test were used to evaluate differences between groups. Relationships between different variables were examined using Spearman's rank correlation test. A multivariate model was subsequently applied to determine the influence of different clinical or demographic parameters in the amount of CD25⁻FOXP3⁺ cells, using linear regression coefficient (*B*) to estimate the association. The amount of CD25⁻FOXP3⁺ cells before and after GC treatment was compared using the Wilcoxon test. Graphs and statistical analyses were performed using the SPSS (version 15.0) or the GraphPad Prism (version 4.0) software.

Results

Enrichment of the CD25⁻FOXP3⁺ population in RA patients

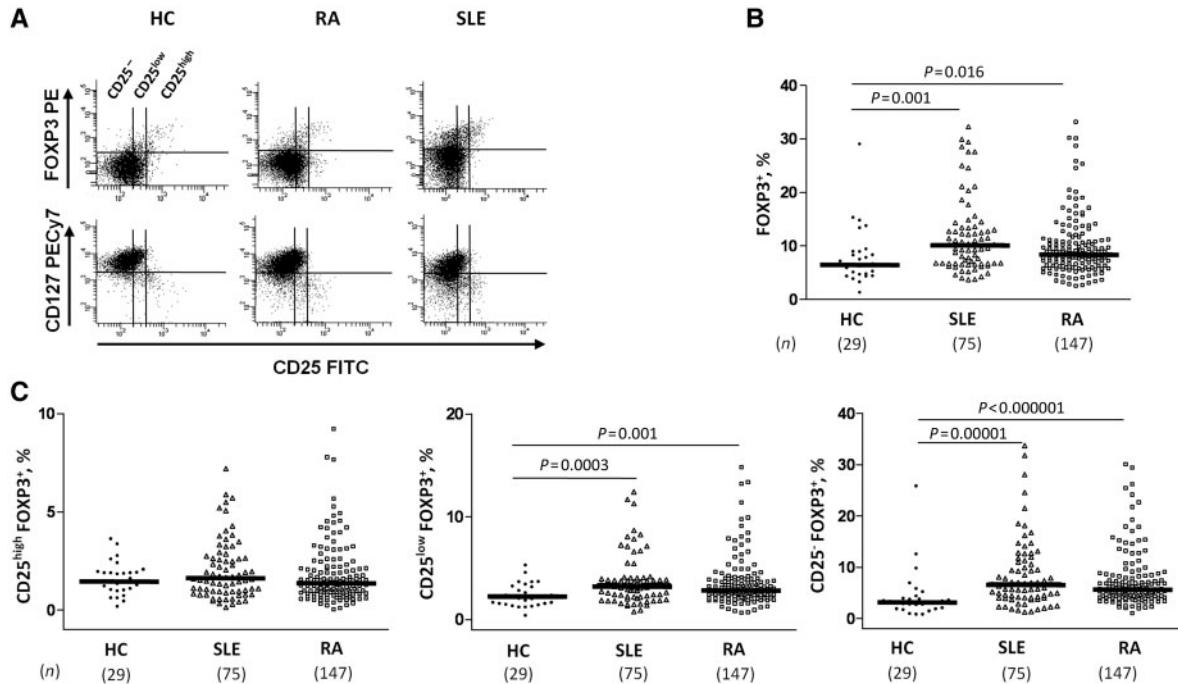
As CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ cells have been found to be increased in SLE patients, we wanted to determine whether this putative Treg population is also altered in RA. To this end we quantified these cells in 147 RA patients, 29 HCs and 75 SLE patients as disease controls. Demographic and clinical details of RA patients are given in Table 1. We analysed FOXP3 and CD127 Treg markers in CD4⁺ lymphocytes subdivided into CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} subsets according to the intensity of CD25 expression (Fig. 1A). Fig. 1B showed that the percentage of total FOXP3⁺ cells among CD4⁺ lymphocytes was significantly higher in patients with RA [8.47 (4.89)] and SLE [10.22 (6.89)] compared with controls [6.41 (4.23)]. However, the proportion of CD25^{high}FOXP3⁺ cells, the so-called natural Tregs, was not statistically different in

TABLE 1 Characteristics and disease parameters of RA patients

Variable	Value
Total RA patients, <i>n</i>	147
Age at diagnosis, years	51.43 (15.80)
Sex, female/male, <i>n</i>	117/30
Disease duration, months	12 (0–92)
DAS-28	3.62 (1.49)
Number of swollen joint score	2.14 (3.54)
Number of tender joint score	4.78 (5.54)
Duration of morning stiffness, min	46.60 (66.40)
Global status of patient's assessment	29.55 (21.89)
Pain of patient's assessment	3.14 (2.41)
HAQ	0.66 (0.65)
CRP, mg/dl	0.49 (0.85)
ESR, mm/h	22.64 (19.27)
RF positivity	78 (58.6)
Anti-CCP positivity	81 (61.8)

Values are the mean (interquartile range) except for disease duration, which is median (range), and the presence of RF and anti-CCP, which are *n* (%).

Fig. 1 FOXP3 expression in CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} cells from RA patients. Peripheral blood samples from HCs, RA and SLE patients were analysed by flow cytometry after staining extracellularly for CD4, CD25 and CD127, and intracellularly for FOXP3. **(A)** Representative dot plots from HC, RA and SLE patients. CD25⁻ cells were determined using the corresponding isotype control and CD25⁺ cells were divided into CD25^{low} and CD25^{high} according to shown regions. **(B)** Percentage of total FOXP3⁺ cells among CD4⁺ lymphocytes in HCs and patients with SLE and RA. **(C)** Frequency of CD25^{high}, CD25^{low} and CD25⁻ cells expressing FOXP3 among CD4⁺ lymphocytes from HCs and patients with RA and SLE. Differences between patients and controls were assessed by the Mann-Whitney U-test.



patients and controls [SLE 1.65 (1.91); RA 1.39 (1.33); HCs 1.47 (0.91)], thus the differences were due to non-CD25^{high} cells (Fig. 1C). In fact, the frequency of CD25⁻ and CD25^{low} cells expressing FOXP3 among CD4⁺ lymphocytes was markedly increased in SLE and RA patients [CD25⁻FOXP3⁺: SLE 6.71 (7.25), RA 5.82 (3.95), HC 3.13 (2.17); CD25^{low}FOXP3⁺: SLE 3.42 (1.86), RA 2.93 (1.57), HC 2.19 (1.69)].

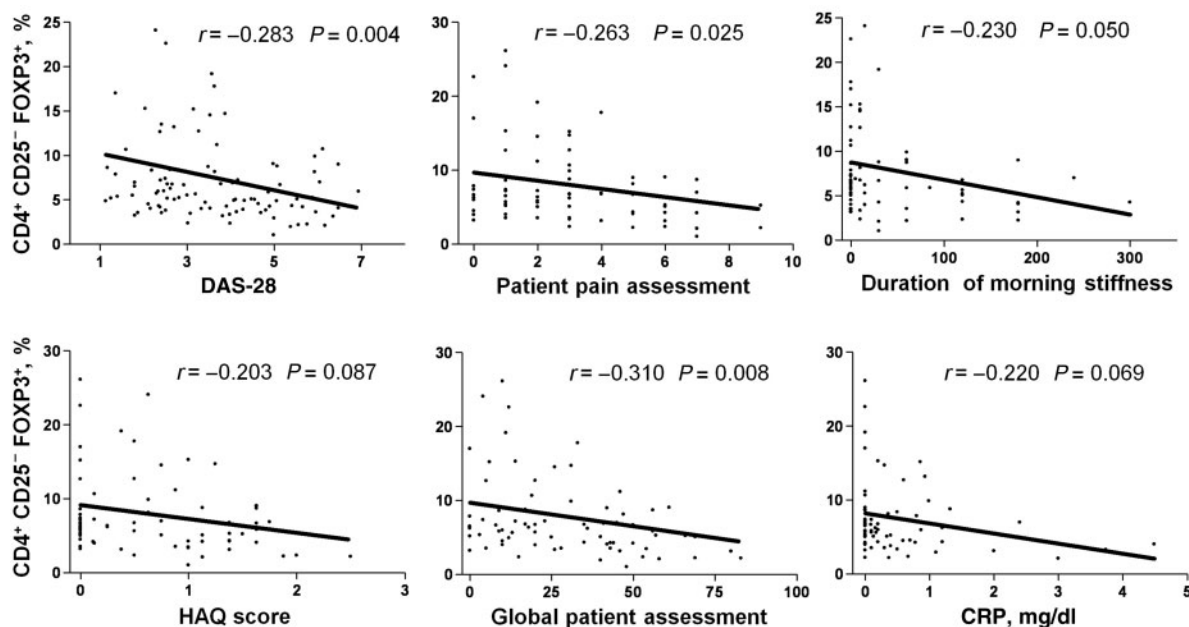
The function and the clinical significance of CD25⁻ and CD25^{low} FOXP3⁺ cells remain as yet unknown. In our RA patient group, the up-regulation of CD25⁻FOXP3⁺ cells does not correlate with age or any specific treatment and was slightly higher in males compared with females [6.97 (5.17) vs 5.46 (3.96), $P=0.039$]. However, the analysis of clinical features showed that this subset correlated negatively with DAS-28, patient pain assessment, global patient assessment and duration of morning stiffness, the same trend being observed for CRP and HAQ (Fig. 2). Of note, no significant clinical or demographic correlations were observed with CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells. In fact, when age, sex and Treg population were included in a linear regression model, the previous associations between CD25⁻FOXP3⁺ cells and clinical features showed a similar trend (DAS-28: $B=-0.958$, $P=0.012$; patient pain assessment: $B=-0.528$, $P=0.084$; global patient assessment: $B=-0.061$, $P=0.072$; duration of morning

stiffness: $B=-0.019$, $P=0.086$; CRP: $B=-1.361$, $P=0.101$; HAQ: $B=-1.949$, $P=0.099$). These data indicated an inverse relationship of CD25⁻FOXP3⁺ population with disease activity. Conversely, CD25^{low}FOXP3⁺ cells correlated with CRP ($r=-0.263$, $P=0.029$), but not with any other disease feature. In addition, the CD25^{low}CD127^{-/low} population was increased compared with controls in both RA [5.78 (2.88) vs 5.18 (2.11), $P=0.024$] and SLE [6.14 (3.52) vs 5.18 (2.11), $P=0.019$] patients, though no differences were observed in the percentage of CD25⁻CD127^{-/low} cells. These results suggest that the CD25^{low}FOXP3⁺ population includes recently activated lymphocytes rather than regulatory T cells.

IL-10 polymorphism influences CD25⁻FOXP3⁺ levels in steroid-treated RA patients

We have previously reported increased FOXP3 gene expression in steroid-treated RA patient carriers of the high IL-10 producer genotype (-1082GG), associated with good response to GC treatment. We therefore wondered whether carriage of this genotype was related with the amount of CD25⁻FOXP3⁺ cells. To this end we determined the allele present at the -1082 IL-10 position to classify patients and controls in genetically high (GG) or low (AA/AG) IL-10 producers (supplementary Table S1, available at *Rheumatology* Online). Fig. 3A shows that

Fig. 2 Size of CD25⁻FOXP3⁺ population in RA patients is inversely associated with disease parameters. Correlations between the percentage of CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ cells and disease activity (DAS-28) or other clinical variables were performed using Spearman's rank correlation test.



the IL-10 genotype did not influence the amount of CD25⁻FOXP3⁺ cells in controls or in the entire RA patient group. However, patient carriers of the high IL-10 genotype treated with prednisone [mean dose (s.d.) 5.63 (1.71) mg/day] presented significantly higher levels of this population compared with patients undergoing other therapies (MTX, LEF or TNF- α blockers) and with low producer users of prednisone [mean dose (s.d.) 4.89 (0.73) mg/day] (Fig. 3B). These data suggest that CD25⁻FOXP3⁺ cells could play a role in the response to GC treatment but only in IL-10 GG carriers.

IL-10 polymorphisms influence the cytokine balance in steroid-treated patients

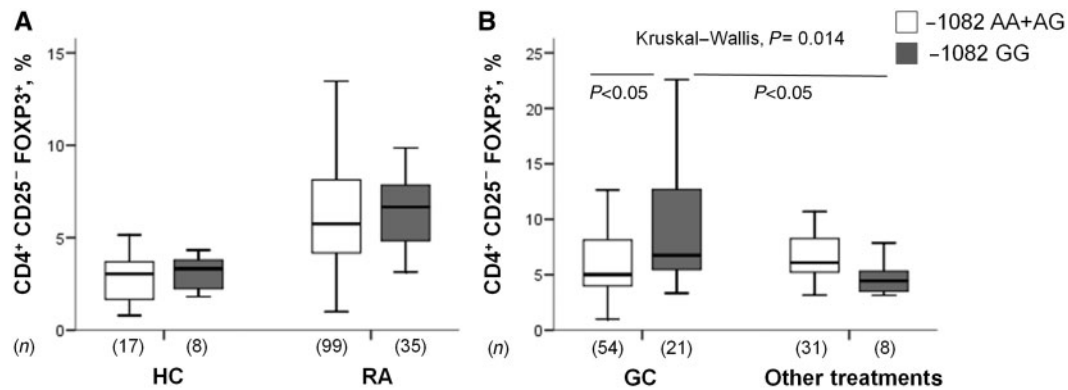
In addition to FOXP3 expression, IL-10 production was widely associated with immune suppression and down-regulation of autoimmune responses, thus both mechanisms could be involved in GC response. It has recently been reported that IL-10 genetic polymorphisms also influence serum levels of cytokines in steroid-treated patients, though nothing is known about their possible effect on different subpopulations of circulating effector Th cells. We accordingly evaluated the influence of the IL-10 genotype on the amount of cytokine-producing cells, analysing by means of flow cytometry the intracellular accumulation of IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α in CD4⁺ T lymphocytes after 5 h of stimulation with ionomycin plus PMA (Fig. 4A). No significant differences were detected in any tested cytokine between patients treated with GC and those receiving any other treatment (supplementary Table S2, available at *Rheumatology* Online).

On the other hand, genotype analysis did indicate that the frequency of IL-10-producing cells was slightly, though not significantly, increased in high IL-10 producers [0.58 (0.91) vs 0.35 (0.43), $P=0.06$], whereas no differences were observed in the amount of positive cells for the other tested cytokines (supplementary Table S3, available at *Rheumatology* Online). This trend, however, appears to be due to patients receiving GC (Fig. 4B), as IL-10⁺ CD4⁺ T cells were significantly higher in -1082GG compared with -1082AA/AG individuals in this group [0.58 (0.64) vs 0.35 (0.46), $P=0.024$], though not in patients undergoing other treatments (MTX, LEF or TNF- α blockers). Moreover, the ratios between frequencies of cytokine-producing cells showed that the relative amount of pro-inflammatory effector Th1 and Th17 cells (positive cells for IFN- γ , TNF- α or IL-17 vs IL-10) was significantly reduced in high IL-10 producers in RA patients under GC treatment, but not in those receiving any other therapy (Fig. 4B).

CD25⁻FOXP3⁺ cells increase after GC treatment in high IL-10 producers

Finally, to confirm the effect of prednisone therapy in RA, we analysed CD25⁻FOXP3⁺ cells before and after 3 and 6 months of GC treatment in 15 patients genotyped as high [$n=7$; mean dose (s.d.) 5.47 (1.50) mg/day] or low [$n=8$; mean dose (s.d.) 5.0 (0.00) mg/day] IL-10 producers. To ascertain the clinical response to treatment, DAS-28 was determined at the time of sample collection, calculating the absolute change in DAS-28 (Δ DAS-28) as a measure of treatment effectiveness. Results showed an increase in

Fig. 3 IL-10 genotype influences CD25[−]FOXP3⁺ population in steroid-treated patients. HCs and RA patients were classified as genetically high (−1082GG) or low (−1082AA/AG) IL-10 producers. **(A)** No differences attributable to the IL-10 genotype were observed in the percentage of CD4⁺CD25[−]FOXP3⁺ cells in HCs or in RA patients. **(B)** The CD4⁺CD25[−]FOXP3⁺ population was increased in patient carriers of the high IL-10 genotype who were users of GC treatment. Other treatments: MTX, LEF or TNF- α blockers. Differences were assessed by the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s multiple comparison post test.



the amount of CD25[−]FOXP3⁺ after 6 months in all patients ($P=0.008$, Wilcoxon test). However, after patient stratification by genotype (Fig. 5), significant differences were observed in carriers of the high IL-10 genotype ($P=0.043$), though not in low IL-10 producers ($P=0.123$). Moreover, striking differences between genotypes were detected after 3 months of treatment ($P=0.007$), Δ DAS-28 after 6 months being accordingly higher in −1082GG patients.

Discussion

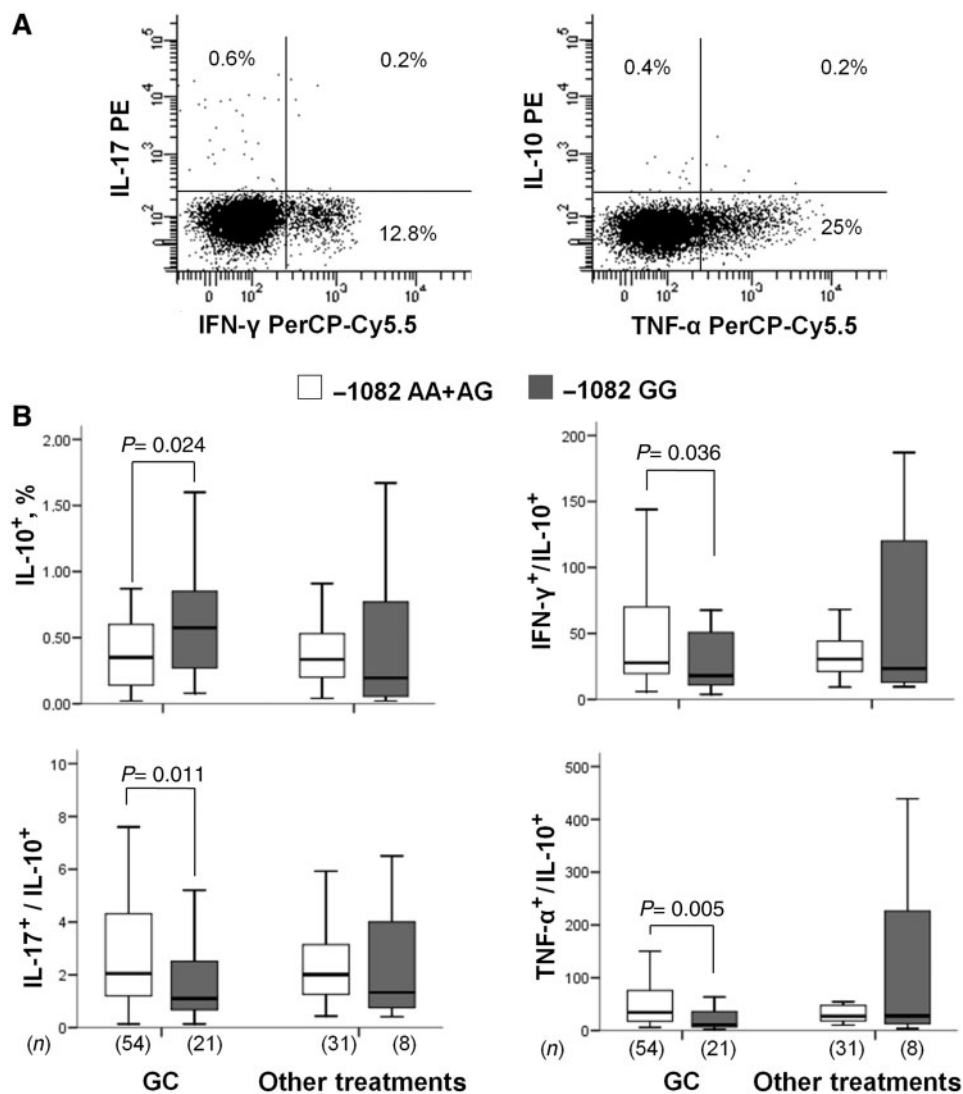
The present study shows an increased frequency of CD25[−]FOXP3⁺ and CD25^{low}FOXP3⁺ cells in RA patients similar to that observed in SLE patients. FOXP3 expression has been revealed to be essential for both the development and function of CD25^{high}FOXP3⁺ cells, the conventional Treg population [9, 29]. There is evidence, however, indicating that FOXP3 expression can also be induced on peripheral CD4⁺CD25[−] T cells upon activation [30], although conflicting data have been reported concerning the stability of the expression and the suppressive capacity of these cells [31]. In fact, in our RA patient group, the CD25^{low} population, in addition to raised FOXP3 levels, presented an increased number of CD127^{−/low} cells, a molecule down-regulated after activation [8], thus suggesting that the CD25^{low}FOXP3⁺ population represents recently activated lymphocytes, more abundant in patients with autoinflammatory diseases, rather than regulatory T cells. This result was not observed in the CD25[−] subset.

The enrichment of CD25[−]FOXP3⁺ cells detected in our study is consistent with other reports that examined this population in SLE and multiple sclerosis patients [5, 6, 32], but has not been previously reported in RA patients. Although Lin *et al.* [4] analysed CD25[−]FOXP3⁺ cells in RA patient users and non-users of etanercept therapy,

no significant differences with controls were detected. The heterogeneity of RA disease could be the basis of this discrepancy, since ~25% of our unselected RA patient group presented normal levels of CD25[−]FOXP3⁺ cells [HC median (interquartile range) 3.13 (2.17); RA 25th percentile: 4.18], thus suggesting that this alteration could be associated with specific disease features. Despite the fact that the CD25[−]FOXP3⁺ subset represents a significant proportion of total FOXP3⁺ cells both in patients (5.82% out of 8.47%) and in controls (3.13% out of 6.41%), its role and function remain unknown. In this regard, the negative correlation observed with disease activity could suggest that CD25[−]FOXP3⁺ cells may possess a regulatory function or, alternatively, that the size of this population may be secondary to changes in inflammatory status or specific clinical features. Otherwise, the expression of FOXP3 in CD25[−] cells could be an autoregulatory mechanism to induce T-cell anergy, a FOXP3-associated feature in non-suppressive cells [2], thus explaining the increased proportion of CD25[−]FOXP3⁺ cells in RA and SLE patients and the negative association detected with disease activity.

A variety of evidence indicates that an increase in the amount of regulatory or hyporesponsive T cells during the evolution of the disease would be a good prognostic sign of disease outcome, thus underlining the interest of up-regulating these populations. In this respect, GC treatment has been reported to increase FOXP3 expression and Treg cells in several diseases [18, 19, 21, 24]. In RA, we have previously reported a significant increase in FOXP3 levels in GC-treated patients who are genetically good responders to this therapy. Given the evident advantages of the use of genetic markers, a number of studies have researched the role of functional polymorphisms to predict the likelihood of disease appearance and outcome

Fig. 4 IL-10 genotype influences intracellular cytokine expression in CD4⁺ lymphocytes from steroid-treated patients. PBMCs were stimulated with PMA (20 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of monensin (2 μM) for 5 h. Cells were stained extracellularly with CD4 APC and intracellularly with IL-10 PE and TNF-α PerCP-Cy5.5 or with IL-17 PE and IFN-γ PerCP-Cy5.5. Cytokine accumulation was measured by flow cytometry. **(A)** Representative dot plots from an RA patient. **(B)** Percentage of IL-10-producing cells and their ratio with IFN-γ-, IL-17- and TNF-α-positive lymphocytes in RA patients who were users and non-users of GC treatment. Other treatments: MTX, LEF or TNF-α blockers. Differences between genotypes were determined by the Mann-Whitney U-test.

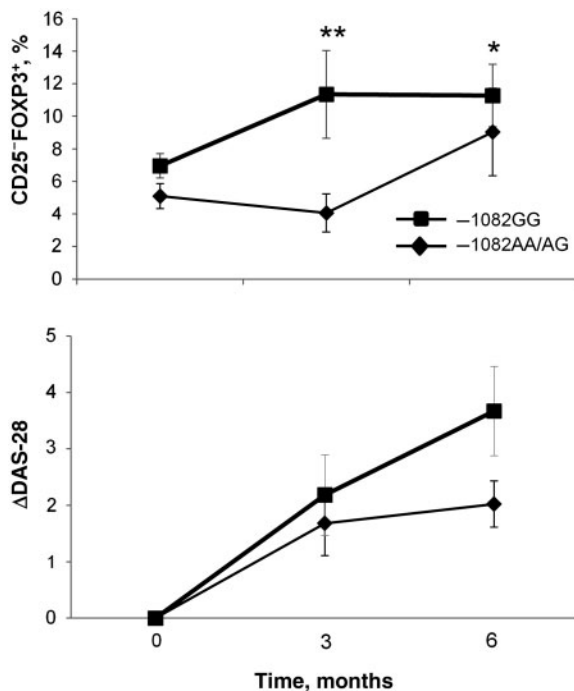


and the response to treatments. In fact, it has been reported that carriage of the high IL-10 genotype (-1082GG) could be a predictor of good response to GC in patients with several diseases, including RA [23, 25, 26, 28]. Therefore this valuable effect could be partially mediated by the increase in regulatory populations. Our results indicate that GC-treated patient carriers of the high IL-10 genotype have higher levels of CD25⁻FOXP3⁺ cells than patients with another genotype or with the same genotype, though treated with another therapy. Moreover, this association was corroborated in

a prospective study analysing genetically low and high IL-10 patients before and after 3 and 6 months of prednisone treatment. In spite of the unknown origin and function of CD25⁻FOXP3⁺ cells, these findings support a role of this population in the clinical response to GC therapy.

It has been proposed that one mechanism by which GCs might exert their beneficial effects on autoimmunity could be by up-regulating the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, which in turn down-regulates the inflammatory process. In fact, increased levels of IL-10 following GC administration are well documented in RA

Fig. 5 CD25⁻FOXP3⁺ cells increase after prednisone treatment in genetically high IL-10 producers. CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ cells were analysed before ($t=0$) and after 3 and 6 months of prednisone treatment in 15 patients genotyped as high ($n=7$) or low ($n=8$) IL-10 producers. The absolute change in DAS-28 (Δ DAS-28) was determined as a measure of treatment effectiveness. The percentage of CD25⁻FOXP3⁺ cells before and after treatment was compared using the Wilcoxon test: $*P=0.043$ between 0 and 6 months in -1082GG patients. Differences between genotypes at each point in time were determined by the Mann-Whitney U-test: $**P=0.007$ at $t=3$.



and other medical conditions [33–35]. Serum levels of IL-10, a cytokine with a number of immunoregulatory effects, have frequently been found to be increased in patients with RA [36, 37]. In this study we observed an increase in the percentage of IL-10-secreting CD4⁺ T cells in GC-treated patient carriers of the high IL-10 genotype in conjunction with relatively low levels of TNF- α , IL-17- and IFN- γ -producing cells. These cytokine balances could be of major relevance for RA outcome. For instance, increased levels of TNF- α , a potent paracrine cytokine able to induce the release of other pro-inflammatory molecules, have been found in joints of RA patients correlated with radiological evidence of bone erosion [38, 39]. Likewise, IL-17 expression is elevated in the synovium of patients with RA and can up-regulate and synergize with local inflammatory mediators such as IL-6, TNF- α and IL-1 β [40, 41]. Moreover, it has been reported that culturing IL-10 and IL-10 receptor-deficient splenocytes

under Th17-polarizing conditions increased Th17 cells and IL-17 secretion, whereas the addition of IL-10 significantly decreased IL-17-producing cells [42]. Studies to identify the role of IFN- γ in RA have yielded controversial results. However, a number of studies have provided evidence supporting their relevance in the susceptibility and severity of RA [43, 44].

To sum up, the present study shows an elevated proportion of CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ cells in RA patients, which were negatively associated with disease activity and other clinical parameters. Furthermore, prednisone treatment appears to play a role in the up-regulation of this population, but only in patient carriers of the IL-10 good-responder genotype for this therapy. This association, not previously reported, could have important implications in the context of the control of inflammation and development of RA. Finally, the relatively low amounts of IL-17-, IFN- γ - and TNF- α -positive in addition to the elevated levels of IL-10-secreting CD4⁺ T cells observed in genetically high IL-10 patients under prednisone treatment could partly explain the beneficial effects of GC and support the relevance of this pharmacogenetic marker as a predictor of treatment response.

Rheumatology key messages

- The CD25⁻FOXP3⁺ population was increased in RA patients and is inversely correlated with disease parameters.
- GC-treated patient carriers of the high IL-10 genotype presented higher levels of CD25⁻FOXP3⁺ cells.

Acknowledgements

Funding: This work was financed by European Union FEDER funds, the Fondo de Investigación Sanitaria (PI080570) and the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (IB08-091). B.dP. was supported by a fellowship from the Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología and C.P. by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology Online*.

References

- 1 Buckner JH, Ziegler SF. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther* 2004;6:215–22.
- 2 Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human

- activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:129–38.
- 3 Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:664–71.
 - 4 Lin SC, Chen KH, Lin CH *et al.* The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 2007;37:987–96.
 - 5 Suen JL, Li HT, Jong YJ, Chiang BL, Yen JH. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009;127:196–205.
 - 6 Zhang B, Zhang X, Tang FL *et al.* Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1037–40.
 - 7 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11.
 - 8 Alves NL, van Leeuwen EM, Derks IA, van Lier RA. Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. *J Immunol* 2008;180:5201–10.
 - 9 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
 - 10 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
 - 11 Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445:766–70.
 - 12 Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8:277–84.
 - 13 Cao D, van VR, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R335–46.
 - 14 Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A *et al.* Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
 - 15 Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L *et al.* CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:360–7.
 - 16 Lawson CA, Brown AK, Bejarano V *et al.* Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology* 2006;45:1210–7.
 - 17 van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004;50:2775–85.
 - 18 Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA *et al.* Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009;119:239–45.
 - 19 Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1512–7.
 - 20 Lopez P, Gomez J, Prado C, Gutierrez C, Suarez A. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-alpha polymorphisms on interferon-alpha, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment. *J Rheumatol* 2008;35:1559–66.
 - 21 Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P *et al.* Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1425–33.
 - 22 Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:3371–80.
 - 23 Castro-Santos P, Suarez A, Lopez-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C. TNFalpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1039–47.
 - 24 de Paz B, Alperi-Lopez M, Ballina-Garcia FJ *et al.* Cytokines and regulatory T cells in rheumatoid arthritis and their relationship with response to corticosteroids. *J Rheumatol* 2010;37:2502–10.
 - 25 de Paz B, Alperi-Lopez M, Ballina-Garcia FJ *et al.* Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha genotypes in rheumatoid arthritis—association with clinical response to glucocorticoids. *J Rheumatol* 2010;37:503–11.
 - 26 Lauten M, Matthias T, Stanulla M *et al.* Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 2002;16:1437–42.
 - 27 Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711–7.
 - 28 Zheng HX, Webber SA, Zeevi A *et al.* The impact of pharmacogenomic factors on steroid dependency in pediatric heart transplant patients using logistic regression analysis. *Pediatr Transplant* 2004;8:551–7.
 - 29 Yagi H, Nomura T, Nakamura K *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643–56.
 - 30 Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003;112:1437–43.
 - 31 Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? *Immunol Lett* 2007;114:9–15.

- 32 Fransson M, Burman J, Lindqvist C *et al.* T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse. *Autoimmunity* 2010;43:590-7.
- 33 Gayo A, Mozo L, Suarez A *et al.* Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998;85:122-30.
- 34 Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D *et al.* Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996;119:76-80.
- 35 Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;28:1960-6.
- 36 Cush JJ, Splawski JB, Thomas R *et al.* Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:96-104.
- 37 Lacki JK, Samborski W, Mackiewicz SH. Interleukin-10 and interleukin-6 in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, correlations with acute phase proteins. *Clin Rheumatol* 1997;16:275-8.
- 38 Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med* 2006; 6:13-9.
- 39 Neidel J, Schulze M, Lindschau J. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1995;44: 217-21.
- 40 Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005;7: 29-37.
- 41 Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 2003;48: 594-601.
- 42 Gu Y, Yang J, Ouyang X *et al.* Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol* 2008;38:1807-13.
- 43 Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D *et al.* Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000;356:820-5.
- 44 Milman N, Karsh J, Booth RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010;43: 1309-14.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Mucho se ha descrito sobre la posible influencia de numerosos genes en la susceptibilidad y evolución de la AR, estando los polimorfismos genéticos que regulan la producción de determinadas citocinas entre los candidatos propuestos. Estudios previos de nuestro grupo y de otros autores pusieron de manifiesto la funcionalidad de los polimorfismos en las posiciones -1082 de la IL-10 y -308 del TNF α por su influencia sobre los niveles basales e inducidos de estas citocinas. Dado que las acciones de las citocinas pueden estar condicionadas por la presencia de otras, parece plausible pensar que el desbalance en los niveles basales de una o varias de estas proteínas podría provocar la pérdida de la interregulación que se establece entre ellas, y en consecuencia favorecer el origen y desarrollo de la enfermedad.

Los resultados de esta Tesis Doctoral revelan la importancia de polimorfismos funcionales presentes en los promotores de la IL-10 y el TNF α tanto en la aparición y fenotipo de la AR como en la respuesta al tratamiento con GC y ponen de manifiesto la implicación de los linfocitos Treg y las citocinas en el mecanismo de acción de estos fármacos.

5.1. Efecto de los polimorfismos de IL-10 y TNF α en la susceptibilidad y desarrollo de anticuerpos

El estudio de la distribución de las frecuencias genotípicas de la IL-10 puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre pacientes y controles encontrándose una asociación entre el genotipo alto productor de IL-10 y el desarrollo de la enfermedad, lo que ha sido documentado por otros autores (158;162;163;189;190) . Sin embargo, existen otros estudios sobre esta asociación con resultados contradictorios (62;159;191;192), presumiblemente debido a las importantes variaciones

en la distribución de estos polimorfismos en las diversas poblaciones. En cuanto al polimorfismo -308TNF α , la comparación de las frecuencias genotípicas entre pacientes de AR y controles sanos de nuestra población no mostró diferencias significativas, aunque se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia del genotipo bajo productor en la población de pacientes, ya descrito en otros estudios (184;193). Es bien conocido que la IL-10 y el TNF α son citocinas que se regulan mutuamente y ejercen funciones opuestas en la respuesta inflamatoria de manera que, el TNF α induce la producción de IL-10, y ésta a su vez reduce la síntesis de TNF α como un mecanismo para mantener la homeostasis inmunológica. En este contexto, nuestros resultados confirman una fuerte interacción entre ambas citocinas, siendo aquellos pacientes con genotipo funcional bajo productor de TNF α /alto de IL-10 los que presentan una mayor susceptibilidad a padecer AR.

Por otra parte, nuestras propias observaciones y las realizadas por otros grupos de investigación, tanto en AR como en otras enfermedades autoinmunes, sugieren la existencia de varias asociaciones entre los polimorfismos de estas citocinas y el desarrollo de diferentes autoanticuerpos (194-198). La presencia de anti-CCP en pacientes con AR años antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos (199;200), su alta especificidad y su baja prevalencia en población sana les confiere una gran capacidad de discriminación en el diagnóstico diferencial de la AR respecto a otras enfermedades reumatológicas (201).

La asociación encontrada en nuestro estudio entre el genotipo -1082IL-10AA (bajos productores de la citocina) con la aparición de anti-CCP no había sido descrita anteriormente y aporta una información adicional que apoya y facilita el diagnóstico de la enfermedad.

Estos resultados sugieren que, a pesar de los efectos estimuladores de la IL-10 sobre los linfocitos B y la generación de anticuerpos, la presencia de éstos podría verse favorecida por los bajos niveles de IL-10 en los portadores del genotipo bajo productor, lo cual, no permitiría un adecuado

control de la respuesta inflamatoria. Hipotéticamente, los bajos niveles de IL-10 provocarían un aumento de la exposición a autoantígenos, debido a que la IL-10 favorece la eliminación de desechos de la respuesta inmune aumentando la fagocitosis de partículas opsonizadas. De este modo, en el proceso inflamatorio, cuando la apoptosis es masiva o existe un defecto en el aclaramiento de los detritus celulares podría existir una liberación de proteínas citrulinadas y enzimas PAD activas al espacio sinovial capaces de citrulinar otras proteínas de la sinovial articular. En la mayoría de los casos este proceso sería autolimitado, sin embargo, aquellos sujetos predispuestos en virtud de sus moléculas HLA tipo II serían capaces de presentar estas proteínas citrulinadas a linfocitos T, generando una respuesta aberrante de linfocitos B con producción de autoanticuerpos y complejos inmunes capaces de perpetuar la actividad inflamatoria, convirtiéndose en un proceso inflamatorio crónico que facilitaría el desarrollo de la enfermedad.

El incremento local en la síntesis de $\text{TNF}\alpha$ no podría ser contrarrestado debido a una baja producción de IL-10 promoviéndose la apoptosis y la exposición a moléculas propias y creando un microambiente en el que se favorecería la respuesta inflamatoria en aquellos pacientes portadores del genotipo alto $\text{TNF}\alpha$ /bajo IL-10.

Dado que la presencia de anti-CCP en los pacientes de AR se ha considerado asociado con formas más agresivas de la enfermedad (66;68), nuestros resultados parecen indicar que el ser portador de un genotipo bajo productor de IL-10 conlleva una forma de enfermedad más severa, caracterizada por presencia de anticuerpos, y apoya la hipótesis del relevante papel que ocupan el $\text{TNF}\alpha$ y la IL-10 en la enfermedad.

En contraposición, un efecto protector frente a la aparición de anti-CCP correspondería al genotipo alto de IL-10, siendo los portadores del alelo -1082G*, especialmente los que además son bajos productores de $\text{TNF}\alpha$, los que presentarían una menor respuesta inmune adaptativa frente a estas moléculas o bien estos antígenos no estarían expuestos al sistema inmune y no desarrollarían anticuerpos frente a ellas. Es importante

resaltar que este efecto protector del genotipo alto de IL-10 sobre la aparición de anti-CCP aumentó cuando se estudiaron los genotipos combinados alto de IL-10/bajo de TNF α , sugiriendo, una vez más, una interacción entre los efectos de los niveles de ambas citocinas, al igual que ocurría en la susceptibilidad. Los portadores del alelo -1082G*, especialmente los que además son bajos productores de TNF α , presentarían una menor respuesta inmune adaptativa frente a estas moléculas o bien estos antígenos no estarían expuestos al sistema inmune por lo que no desarrollarían anticuerpos frente a ellas. *Vasilopoulos Y y col. (202)* apoyan nuestra hipótesis proponiendo usar el estudio conjunto de polimorfismos genéticos y autoanticuerpos como predictores para la respuesta clínica al tratamiento.

5.2. Influencia del genotipo en la evolución y respuesta al tratamiento

El efecto del genotipo funcional de la IL-10 y el TNF α sobre la respuesta al tratamiento, en concreto con GC, mostró uno de los resultados más interesantes y con mayor repercusión en la práctica clínica.

Los GC son potentes reguladores de la actividad transcripcional (transactivación o transrepresión) de multitud de genes con función inmunológica, siendo la prednisona uno de los glucocorticoides más frecuentemente usados en el tratamiento de la AR, habitualmente en combinación con otros DMARD. Sin embargo, la respuesta a este tratamiento, al igual que ocurre con la mayoría de las terapias, no es uniforme y muchos pacientes no responden adecuadamente. Nuestros resultados sugieren que la presencia del genotipo alto productor de IL-10 determinaría un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, sin embargo, son estos mismos pacientes los que experimentan un mayor grado de mejoría como consecuencia de una mejor respuesta al tratamiento con corticoides. Resultados previamente publicados tanto por nuestro grupo como por otros autores asociaron el genotipo alto productor de IL-10 con la buena respuesta a corticoides en pacientes con otras patologías (203-205) y

con la buena respuesta al tratamiento con bloqueantes del TNF α en la artritis reumatoide (206;207), sin embargo y hasta el momento no se había analizado la asociación de este genotipo con la respuesta a corticoides en esta enfermedad.

Aunque los mecanismos exactos responsables de las propiedades inmunosupresoras de los glucocorticoides no han sido completamente dilucidados, se sabe que estos agentes son capaces de controlar la respuesta inmune a muchos niveles distintos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual los GC ejercen estas acciones y, de hecho, se han planteado distintos procesos que podría explicar este mecanismo de acción. Nuestros resultados sugieren que tanto las citocinas como las células T reguladoras pueden jugar un importante papel en la respuesta a este tratamiento.

5.2.1. Balance de citocinas

El estudio de los niveles de citocinas tanto en controles como en pacientes con diferente evolución de la enfermedad mostró, como cabía esperar, niveles incrementados de mediadores proinflamatorios (TNF α , IL-6, IL-18 e IL-17), hecho que ha sido ampliamente descrito por otros autores (174;176;178;208), y que indica que este efecto es consecuencia del desarrollo y posterior mantenimiento de la situación inflamatoria característica de esta enfermedad. Del mismo modo, encontramos niveles disminuidos de citocinas antiinflamatorias (TGF β e IL-10) sugiriendo la incapacidad del sistema inmune para controlar la respuesta inflamatoria en estos pacientes (209). De manera llamativa, encontramos niveles elevados de IL-6 en pacientes al diagnóstico, disminuyendo paralelamente con la actividad de la enfermedad y otros parámetros clínicos a medida que la patología evoluciona. Nuestro trabajo sugirió la posibilidad de que la IL-6 pudiese constituir un primer marcador de respuesta al tratamiento que trabajos posteriores de otros grupos pudieron constatar (136;210;211).

Multitud de citocinas proinflamatorias son antagonizadas por GC incluyendo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-16, GM-CSF, TNF α , IL-8, IL-17... (34;212). Nuestros estudios sugieren que estos efectos son particularmente importantes en el caso de los individuos portadores del genotipo alto de IL-10/bajo de TNF α tratados con corticoides donde se pudo comprobar un descenso significativo en los niveles relativos de TNF α e IL-17, mediadores fundamentales en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio en la AR (213;214).

Varios autores han descrito la capacidad de los corticoides para aumentar los niveles de IL-10 tanto in vivo como in vitro (27;29), lo que sugiere que parte del efecto beneficioso inmunosupresor puede estar mediado por IL-10. De hecho, un incremento en los niveles de IL-10 seguido de la administración de glucocorticoides ha sido encontrado en pacientes de artritis reumatoide y otras enfermedades (215-217), habiéndose propuesto que niveles altos de IL-10 podrían incrementar y mejorar la sensibilidad a GC llevándose a cabo por distintos mecanismos moleculares (218-220). Nuestros estudios corroboran esta teoría donde observamos un aumento en el porcentaje de células T CD4 productoras de IL-10 sólo en pacientes portadores del genotipo “buen respondedor” tratados con GC unido a una relativa disminución de los niveles de células Th17 y Th1, productoras de IL-17, TNF α e IFN- γ .

El descubrimiento de la asociación del polimorfismo de la IL-10 y el TNF α y la buena respuesta a corticoides en AR es, sin duda, de gran importancia clínica, postulándose como dos relevantes marcadores que junto al desarrollo de anticuerpos podrían posicionarse como dos factores claves que condicionarían la progresión de la enfermedad y su tratamiento y abre el camino al estudio y establecimiento de un tratamiento eficaz e individualizado. Al mismo tiempo, este descubrimiento adquiere una gran importancia teórica ya que nos proporciona información sobre los posibles mecanismos que se encuentran tras el desarrollo de la respuesta a esta medicación y la aparición de anticuerpos. Sin embargo, no podemos descartar otros factores, como los ambientales y/o genéticos, haciéndose

necesarios múltiples estudios para un total entendimiento de los mecanismos moleculares y de actuación.

5.2.2 Expresión de Foxp3 y células T reguladoras

Recientes estudios realizados en ratones y humanos han puesto de manifiesto la posibilidad de que los corticoides ejerzan parte de sus acciones anti-inflamatorias mediante la generación o expansión de células Treg. Un incremento en la expresión de FOXP3 y células Treg en distintas enfermedades incluyendo la artritis reumatoide (221-224) ha sido ampliamente descrito después del tratamiento con corticoides.

En nuestro estudio, una vez más, son los pacientes portadores del genotipo buen respondedor a corticoides (alto IL-10/bajo TNF α) los que presentan niveles incrementados de FOXP3, factor indispensable en para la inducción de la función y diferenciación de las células T reguladoras (225-227). Una posible explicación a estos resultados se encuentra en el efecto beneficioso de la prednisona para aumentar la secreción de TGF β .

El TGF β es un factor clave en la señalización de Foxp3 (228), la expansión in vivo y la capacidad supresora de las células Treg (229). Un estudio reciente demostró que el bloqueo de TGF β inhibía la expansión de Treg. La anulación de su actividad supresora estaba mediada por una combinación de anticuerpos anti-TGF β y anti-IL-10, sugiriendo la necesaria actuación de ambas citocinas inmunoreguladora para el funcionamiento óptimo de las células Treg (230). De este modo, los corticoides y más concretamente la prednisona favorecería un adecuado funcionamiento y actuación de las células T reguladoras únicamente en pacientes buenos respondedores a la terapia (altos de IL-10/bajos TNF α).

Para un correcto mantenimiento de la homeostasis inmunológica, las células T reguladoras poseen la capacidad de controlar la producción de citocinas pro-inflamatorias. Una disfunción en este mecanismos se refleja en los pacientes de AR, donde debido al carácter inflamatorio de la

enfermedad se detectaron altos valores de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-18, IL-6, IL-17), como cabía esperar. Sin embargo, su asociación con un descenso en la frecuencia de las células Treg y de citocinas contraregulatoras (IL-10 y TGF β), pone de manifiesto un incorrecto y/o insuficiente mecanismo de defensa frente al proceso inflamatorio. El estudio de los mecanismos implicados en este proceso y de los distintos tratamientos para lograr restablecer niveles adecuados de células T reguladoras y con ello restaurar la homeostasis inmunológica, se hace indispensable.

En los últimos años se ha descrito una subpoblación de células FoxP3⁺ sin expresión de CD25, cuya función y origen aún se desconocen, que se encuentra aumentada en los pacientes de LES (231-234), esclerosis múltiple (235) y más recientemente en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (236).

Aunque existen evidencias que indican que la expresión de FoxP3 puede ser inducida en células CD4⁺CD25⁻ T periféricas bajo activación (237) no parece ser el caso en nuestro grupo de pacientes de AR donde no observamos un incremento en la expresión del marcador de activación CD127⁻ en esta población celular. Aún existen muchas controversias sobre la naturaleza y función de las células CD25⁻FoxP3⁺ que parecen desempeñar una función fisiológica, pudiéndose encontrar en individuos sanos. Sin embargo, existen muchas teorías al respecto, una de las cuales, apunta al papel que FoxP3⁺ podría jugar en la inducción de anergia. Es posible que la expresión de este factor de transcripción represente la tendencia de estas células a permanecer hiporespondedoras al estímulo, planteándose la hipótesis de que la expresión de FoxP3 en las células CD25⁻ pudiese constituir un mecanismo autoregulator para inducir anergia en las células T, e incluso en células no supresoras (95) lo que explicaría el incremento de la población CD25⁻ en pacientes con AR.

Por otro lado, también se ha planteado el carácter regulador de estas células, pudiendo constituir un reservorio de células T reg que, tras

estimulación, podrían recuperar la expresión de CD25 y convertirse en células totalmente funcionales (238;239). Nuestros datos sugieren que esta población podría poseer una función reguladora dada su correlación negativa con la actividad (DAS28) y otros parámetros de la enfermedad de la misma forma que ha sido publicada la asociación inversa entre la población de células Treg (CD25^{high}FoxP3⁺) y el DAS28, anticuerpos anti-CCP, ESR, CRP número de articulaciones tumefactas o parámetros de actividad de la enfermedad en estos pacientes. Recientemente se ha demostrado que las células T CD25⁻ que coexpresan la proteína GITR exhiben una actividad supresora consistente y se expanden en LES y síndrome de Sjögren primario. Sería de gran interés por lo tanto, y ya que GITR es una molécula inducible por GC, estudiar esta y otras moléculas para definir si el aumento de las células CD25-FoxP3⁺ que observamos en nuestro estudio en pacientes con AR tratados con CS se debió a un aumento selectivo de linfocitos T CD25-FoxP3⁺ GITR⁺ (240;241). El reclutamiento de células CD25-FoxP3⁺ para expandir el *pool* de células Treg constituiría un mecanismo protector de la homeostasis inmunológica, un intento de controlar las respuestas efectoras agresivas desarrolladas por las células T y B en el proceso patológico.

Dado que únicamente los individuos tratados con corticoides poseedores del genotipo buen respondedor (alto IL-10) a corticoides son los que presentar un incremento significativo en la frecuencia de CD4⁺CD25-FoxP3⁺, es posible que los GC ejerzan parte de sus acciones inmunomoduladoras induciendo la generación de células Tr1 (242). Se podría pensar que las células CD25-FoxP3⁺ de pacientes con AR pudieran ser células reguladoras inducidas por IL-10. Como apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que la expresión de FoxP3 e IL-10 se incrementó y fue fuertemente correlacionada en pacientes asmáticos tratados con GC, mientras que experimentos *in vitro* han demostrado que se expresaron de manera simultánea bajo las condiciones necesarias para el desarrollo de Tr1 en presencia de dexametasona (243). Estos datos indicarían que el tratamiento con GC podría promover la diferenciación hacia células Tr1 por un mecanismo dependiente de FoxP3.

Sin embargo, no podemos descartar que el aumento en esta población esté influenciado por la progresión de la enfermedad o incluso relacionada con alguna característica clínica como ha sido descrito por *Zhang B and col* donde el incremento de la población se ha asociado con un incremento de anticuerpos anti-ADN (234).

Aunque el origen y función de estas células CD25⁻FoxP3⁺ es desconocido, nuestros hallazgos apoyan su implicación en la respuesta clínica a la terapia con glucocorticoides y sus efectos beneficiosos en pacientes portadores del genotipo alto IL-10/bajo TNF α . Por todo ello, la presencia de un gran número de células FoxP3⁺ en la población CD4⁺CD25⁻ deberá ser tenido en cuenta en estudios futuros en los que se aborde la funcionalidad y su implicación en el desarrollo de la AR y la respuesta al tratamiento.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El polimorfismo funcional -1082 (A/G) de la IL-10 se encuentra asociado con la susceptibilidad a padecer artritis reumatoide, estando incrementado en pacientes el alelo relacionado con una alta producción (G*). No se encontraron diferencias en las frecuencias del polimorfismo funcional -308 (G/A) del TNF α .
2. El alelo -1082A* de la IL-10 es un factor de riesgo para el desarrollo de anticuerpos anti-CCP en mujeres con AR. Este efecto es mayor en presencia del genotipo alto productor de TNF α (-308AA/AG).
3. El genotipo alto productor de IL-10 se asocia con una buena respuesta clínica al tratamiento con glucocorticoides en pacientes de AR, especialmente en los portadores del genotipo bajo productor de TNF α .
4. Las alteraciones en los niveles séricos de citocinas aumentan, en general, durante la progresión de la AR. La IL-6, sin embargo, se encuentra notablemente elevada al diagnóstico, disminuyendo con la respuesta tratamiento y de forma paralela a la actividad de la enfermedad.
5. El tratamiento con glucocorticoides se asocia con niveles más elevados de TGF β , FoxP3 y células Treg en los pacientes portadores del genotipo identificado como buen respondedor a esta terapia (alto de IL-10 / bajo de TNF α)
- 6.-Los pacientes de AR presentan un incremento en la subpoblación de linfocitos T CD4+CD25-FoxP3+, similar al observado en pacientes de lupus eritematoso sistémico, que se encuentra asociado negativamente con la actividad de la enfermedad y otros parámetros clínicos.
- 7.- Los pacientes portadores del genotipo alto productor de IL-10 tratados con corticoides presentan una mayor proporción de linfocitos T CD4+CD25-FoxP3+ que los de otros genotipos, además de un incremento

en las células Th secretoras de IL-10 y una disminución relativa de las productoras de TNF α +, IL-17+ e IFN γ +

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

(1) Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36(3):182-8.

(2) Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41(1):88-95.

(3) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, III et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2569-81.

(4) Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(6):650-5.

(5) Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Kallberg H, Ronnelid J, Lundberg I et al. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(6):1072-6.

(6) Nelson JL, Hughes KA, Smith AG, Nisperos BB, Branchaud AM, Hansen JA. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1993; 329(7):466-71.

(7) Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(4):399-402.

(8) Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004; 5(3):151-7.

(9) Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6):1071-9.

(10) MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):30-7.

(11) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205-13.

(12) Deighton C, Criswell LA. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8(5):394-400.

- (13) Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(18):10746-50.
- (14) Jawaheer D, Gregersen PK. Rheumatoid arthritis. The genetic components. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28(1):1-15, v.
- (15) Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75(2):330-7.
- (16) Burkhardt H, Huffmeier U, Spriewald B, Bohm B, Rau R, Kallert S et al. Association between protein tyrosine phosphatase 22 variant R620W in conjunction with the HLA-DRB1 shared epitope and humoral autoimmunity to an immunodominant epitope of cartilage-specific type II collagen in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(1):82-9.
- (17) Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis Rheum* 2005; 52(6):1694-9.
- (18) Orozco G, Alizadeh BZ, Delgado-Vega AM, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D et al. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations. *Arthritis Rheum* 2008; 58(7):1974-80.
- (19) Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; 357(10):977-86.
- (20) Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 2007; 4(9):e278.
- (21) Plenge RM. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(3):262-71.
- (22) Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 2005; 37(5):486-94.
- (23) Furst DE, Keystone EC, Braun J, Breedveld FC, Burmester GR, De BF et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2011. *Ann Rheum Dis* 2012; 71 Suppl 2:i2-45.
- (24) Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther* 2000; 13(3):115-26.

- (25) Pelaia G, Vatrella A, Cuda G, Maselli R, Marsico SA. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci* 2003; 72(14):1549-61.
- (26) Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8):2834-9.
- (27) Mozo L, Suarez A, Gutierrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(3):406-12.
- (28) van der Velden VH. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 1998; 7(4):229-37.
- (29) Gayo A, Mozo L, Suarez A, Tunon A, Lahoz C, Gutierrez C. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998; 85(2):122-30.
- (30) Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L et al. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996; 119(1):76-80.
- (31) Bickel M, Cohen RB, Pluznik DH. Post-transcriptional regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis in murine T cells. *J Immunol* 1990; 145(3):840-5.
- (32) Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem* 1998; 273(48):32312-21.
- (33) Kagoshima M, Ito K, Cosio B, Adcock IM. Glucocorticoid suppression of nuclear factor-kappa B: a role for histone modifications. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 1):60-5.
- (34) Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(1):3-22.
- (35) Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, Nichols C, Fahey AJ, Showe L et al. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009; 119(4):239-45.
- (36) Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1425-33.

- (37) Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(11):1512-7.
- (38) Engvall IL, Svensson B, Boonen A, van der Heijde D, Lerner UH, Hafstrom I. Low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis inhibits collagen type I degradation by matrix metalloproteinases as assessed by serum ICTP--a possible mechanism for specific inhibition of radiological destruction. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(4):733-42.
- (39) Kirwan JR, Bijlsma JW, Boers M, Shea BJ. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD006356.
- (40) Schmidt M, Pauels HG, Luger N, Luger A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* 1999; 163(6):3484-90.
- (41) Waage A, Slupphaug G, Shalaby R. Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Immunol* 1990; 20(11):2439-43.
- (42) Chikanza IC, Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(11):1337-45.
- (43) van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(4):R159.
- (44) Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2000; 2(3):236-43.
- (45) Mewar D, Coote A, Moore DJ, Marinou I, Keyworth J, Dickson MC et al. Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(4):R128.
- (46) Scott DL. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39 Suppl 1:24-9.
- (47) Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, Redlich K, Steiner G, Wagner O. The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now? *Arthritis Res Ther* 2008; 10(3):208.
- (48) Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(10):1662-77.

- (49) Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(4):R94.
- (50) Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010; 233(1):34-54.
- (51) van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 2002; 4(2):87-93.
- (52) van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 2002; 60(10):383-8.
- (53) De RL, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vandekerckhove B et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2005; 52(8):2323-30.
- (54) Snir O, Widhe M, Hermansson M, von SC, Lindberg J, Hensen S et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2010; 62(1):44-52.
- (55) Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(2):120-6.
- (56) van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FH, van Booma-Frankfort C et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17(6):689-97.
- (57) Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(5):427-30.
- (58) Kolfenbach JR, Deane KD, Derber LA, O'Donnell CI, Gilliland WR, Edison JD et al. Autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 precedes clinical onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2633-9.
- (59) Kurki P, Aho K, Palosuo T, Heliövaara M. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum* 1992; 35(8):914-7.
- (60) Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid

factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2741-9.

(61) van Gaalen FA, van AJ, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(7):2113-21.

(62) Padyukov L, Seielstad M, Ong RT, Ding B, Ronnelid J, Seddighzadeh M et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(2):259-65.

(63) van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(4):1117-21.

(64) Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, Schreuder GM, Breedveld FC, Huizinga TW et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(10):3058-62.

(65) van OM, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(1):53-60.

(66) Forslind K, Ahlmen M, Eberhardt K, Hafstrom I, Svensson B. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63(9):1090-5.

(67) Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis* 2004; 63(9):1085-9.

(68) Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(8):1831-5.

(69) Ronnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L et al. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(12):1744-9.

(70) Trouw LA, Huizinga TW, Toes RE. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 Suppl 2:ii132-ii136.

(71) Hassfeld W, Steiner G, Graninger W, Witzmann G, Schweitzer H, Smolen JS. Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993; 32(3):199-203.

(72) Hayem G, Chazerain P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P et al. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(1):7-13.

(73) Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T et al. Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16):7267-71.

(74) Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* 2006; 60(10):648-55.

(75) Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62.

(76) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-64.

(77) Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1701-11.

(78) Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(9):665-74.

(79) Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004; 114(9):1209-17.

(80) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4):345-52.

(81) Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(14):5138-43.

(82) Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47(7-8):1595-600.

- (83) Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184(7):3433-41.
- (84) Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27(4):635-46.
- (85) Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174(4):1783-6.
- (86) Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204(6):1257-65.
- (87) Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118(2):240-9.
- (88) von BH. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6(4):338-44.
- (89) Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Hacker G et al. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2009; 183(1):145-54.
- (90) Manches O, Munn D, Fallahi A, Lifson J, Chaperot L, Plumas J et al. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2008; 118(10):3431-9.
- (91) Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28-50.
- (92) Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(8):585-98.
- (93) Gagliani N, Ferraro A, Roncarolo MG, Battaglia M. Autoimmune diabetic patients undergoing allogeneic islet transplantation: are we ready for a regulatory T-cell therapy? *Immunol Lett* 2009; 127(1):1-7.
- (94) MacDonald TT. T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(6):620-7.

- (95) Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(1):129-38.
- (96) Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol* 2007; 123(1):18-29.
- (97) Abraham M, Karni A, Dembinsky A, Miller A, Gandhi R, Anderson D et al. In vitro induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. *J Autoimmun* 2008; 30(1-2):21-8.
- (98) Valencic E, Piscianz E, Tommasini A, Granzotto M. T cells stimulated in vitro have a suppressive function but do not contain only regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(3):561-6.
- (99) Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van LM, Buckner JH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003; 112(9):1437-43.
- (100) Verhasselt V, Vosters O, Beuneu C, Nicaise C, Stordeur P, Goldman M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34(3):762-72.
- (101) Lourenco EV, La CA. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity* 2011; 44(1):33-42.
- (102) Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008; 253(1-2):92-101.
- (103) van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004; 50(9):2775-85.
- (104) Cao D, van VR, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(4):R335-R346.
- (105) Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(10):1210-7.
- (106) Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32(9):2731-6.
- (107) Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active

rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051:506-14.

(108) Xiao H, Wang S, Miao R, Kan W. TRAIL is associated with impaired regulation of CD4+. *J Clin Immunol* 2011; 31(6):1112-9.

(109) Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; 200(3):277-85.

(110) Ji L, Geng Y, Zhou W, Zhang Z. A study on relationship among apoptosis rates, number of peripheral T cell subtypes and disease activity in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2013.

(111) Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2005; 62(3):312-7.

(112) Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):360-7.

(113) Cao D, Borjesson O, Larsson P, Rudin A, Gunnarsson I, Klareskog L et al. FOXP3 identifies regulatory CD25bright CD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol* 2006; 63(6):444-52.

(114) Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med* 2005; 201(11):1793-803.

(115) Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003; 33(1):215-23.

(116) Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299(5609):1033-6.

(117) van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(3):732-42.

(118) Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108(1):253-61.

- (119) Zanin-Zhorov A, Ding Y, Kumari S, Attur M, Hippen KL, Brown M et al. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* 2010; 328(5976):372-6.
- (120) Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS et al. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* 2004; 172(10):5823-7.
- (121) Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3(2):135-42.
- (122) Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(49):19396-401.
- (123) Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Meta-analysis of the association of CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 2005; 118(1):123-32.
- (124) Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(8):620-6.
- (125) Lee YH, Kim JH, Seo YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Hum Immunol* 2014.
- (126) Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J Immunol* 2004; 172(9):5149-53.
- (127) Wang W, Shao S, Jiao Z, Guo M, Xu H, Wang S. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32(4):887-93.
- (128) Bresnihan B, Roux-Lombard P, Murphy E, Kane D, FitzGerald O, Dayer JM. Serum interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(8):726-9.
- (129) Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999; 104(10):1393-401.
- (130) Yamamura M, Kawashima M, Tani M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M et al. Interferon-gamma-inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(2):275-85.
- (131) Dai SM, Shan ZZ, Xu H, Nishioka K. Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(11):1411-8.

- (132) Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993; 52(3):232-4.
- (133) Firestein GS, Zvaifler NJ. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 1987; 30(8):864-71.
- (134) Smeets TJ, Dolhain RJEM, Miltenburg AM, de KR, Breedveld FC, Tak PP. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88(1):84-90.
- (135) Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M et al. Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000; 356(9232):820-5.
- (136) Milman N, Karsh J, Booth RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010; 43(16-17):1309-14.
- (137) Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002; 169(6):3353-62.
- (138) Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 2003; 48(3):594-601.
- (139) Cho ML, Min SY, Chang SH, Kim KW, Heo SB, Lee SH et al. Transforming growth factor beta 1(TGF-beta1) down-regulates TNFalpha-induced RANTES production in rheumatoid synovial fibroblasts through NF-kappaB-mediated transcriptional repression. *Immunol Lett* 2006; 105(2):159-66.
- (140) Lotz M, Kekow J, Carson DA. Transforming growth factor-beta and cellular immune responses in synovial fluids. *J Immunol* 1990; 144(11):4189-94.
- (141) Girard N, Maingonnat C, Bertrand P, Vasse M, Delpech B. Hyaluronectin secretion by monocytes: downregulation by IL-4 and IL-13, upregulation by IL-10. *Cytokine* 1999; 11(8):579-84.
- (142) Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96(5):2304-10.
- (143) Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994; 93(1):424-8.

- (144) Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(5):1890-3.
- (145) de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te VA, Figdor C et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174(4):915-24.
- (146) Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993; 151(3):1224-34.
- (147) Lindsay JO, Hodgson HJ. Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10--a therapy for Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(11):1709-16.
- (148) van Roon JA, Lafeber FP, Bijlsma JW. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(1):3-12.
- (149) Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm* 2001; 10(2):51-9.
- (150) Le T, Leung L, Carroll WL, Schibler KR. Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. *Blood* 1997; 89(11):4112-9.
- (151) Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349(9069):1912-3.
- (152) Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin CE, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001; 72(8):1444-50.
- (153) Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75(5):711-7.
- (154) Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(1):96-104.
- (155) Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1996; 39(3):386-95.

- (156) Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- (157) Perez L, Orte J, Brieva JA. Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. *Arthritis Rheum* 1995; 38(12):1771-6.
- (158) Ates O, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol* 2008; 27(10):1243-8.
- (159) Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6):1093-100.
- (160) Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, Jonas B, Huizinga T, Field M et al. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. *Lancet* 1998; 352(9136):1282-3.
- (161) Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA et al. Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. *J Rheumatol* 2004; 31(3):422-5.
- (162) Paradowska-Gorycka A, Tremler J, Maciejewska-Stelmach J, Lacki JK. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. *Int J Immunogenet* 2010; 37(4):225-31.
- (163) Pawlik A, Kurzawski M, Szklarz BG, Herczynska M, Drozdziak M. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2005; 24(5):480-4.
- (164) Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007; 56(8):2549-56.
- (165) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(9):3666-70.
- (166) Abbas A LAPJ. *Inmunología celular y molecular*. [11], 248-58. 2000.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (167) Field M. Tumour necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases. *QJM* 2001; 94(5):237-46.
- (168) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51(6):605-12.

- (169) Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282(6):561-8.
- (170) Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49(1):74-8.
- (171) Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34(5):391-9.
- (172) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):3195-9.
- (173) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* 1994; 94(3):1012-8.
- (174) Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36(2):96-9.
- (175) Neidel J, Schulze M, Lindschau J. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1995; 44(5):217-21.
- (176) Chen DY, Hsieh TY, Chen YM, Hsieh CW, Lan JL, Lin FJ. Proinflammatory cytokine profiles of patients with elderly-onset rheumatoid arthritis: a comparison with younger-onset disease. *Gerontology* 2009; 55(3):250-8.
- (177) Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2001; 2(9):771-3.
- (178) Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2006; 25(4):448-52.
- (179) Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 Suppl 1:I20-I26.
- (180) Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(3):163-72.
- (181) Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM et al. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36(5):516-21.

- (182) Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, Pacheco D et al. Tumour necrosis factor (TNF)alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNFalpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006; 35(6):435-40.
- (183) Guis S, Balandraud N, Bouvenot J, Auger I, Toussirot E, Wendling D et al. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 57(8):1426-30.
- (184) Mosaad YM, Abdelsalam A, El-Bassiony SR. Association of tumour necrosis factor-alpha -308 G/A promoter polymorphism with susceptibility and disease profile of rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 2011; 38(5):427-33.
- (185) Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, Revirion D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7):1849-52.
- (186) Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Wang S, Li G, Gao J et al. Association between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter -308 G/A and response to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol* 2013; 23(3):489-95.
- (187) Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343(22):1594-602.
- (188) Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997; 337(3):141-7.
- (189) Gambhir D, Lawrence A, Aggarwal A, Misra R, Mandal SK, Naik S. Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. *Rheumatol Int* 2010; 30(9):1211-7.
- (190) Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39(1):81-7.
- (191) Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J et al. Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage? *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39(11):1180-8.
- (192) Moreno OM, Gonzalez CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martin J et al. [Polymorphisms of IL-10 gene promoter and rheumatoid arthritis in a Colombian population]. *Biomedica* 2007; 27(1):56-65.

- (193) Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, McDermott MF, Shanahan F et al. Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families. *Genes Immun* 2001; 2(2):82-7.
- (194) Castro-Santos P, Suarez A, Mozo L, Gutierrez C. Association of IL-10 and TNFalpha genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007; 122(1):108-14.
- (195) Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 27(2):142-5.
- (196) Schotte H, Gaubitz M, Willeke P, Tidow N, Assmann G, Domschke W et al. Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with the anti-Sm immune response. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(11):1357-63.
- (197) Suarez A, Lopez P, Mozo L, Gutierrez C. Differential effect of IL10 and TNF{alpha} genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(11):1605-10.
- (198) Wieczorek S, Hellmich B, Arning L, Moosig F, Lamprecht P, Gross WL et al. Functionally relevant variations of the interleukin-10 gene associated with antineutrophil cytoplasmic antibody-negative Churg-Strauss syndrome, but not with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6):1839-48.
- (199) Nielen MM, van SD, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):380-6.
- (200) van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2006; 6(1):37-41.
- (201) Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Use and significance of anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(1):20-5.
- (202) Vasilopoulos Y, Bagiatis V, Stamatopoulou D, Zisopoulos D, Alexiou I, Sarafidou T et al. Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFRII susceptibility variant with anti-TNF-alpha response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29(4):701-4.
- (203) Castro-Santos P, Suarez A, Lopez-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C. TNFalpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(5):1039-47.

- (204) Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* 2002; 16(8):1437-42.
- (205) Zheng HX, Webber SA, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J et al. The impact of pharmacogenomic factors on steroid dependency in pediatric heart transplant patients using logistic regression analysis. *Pediatr Transplant* 2004; 8(6):551-7.
- (206) Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M, Ernestam S, Cederholm T, Lundkvist I et al. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(6):526-9.
- (207) Seitz M, Wirthmüller U, Moller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(1):93-6.
- (208) Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(4):R126.
- (209) Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4(3):208-17.
- (210) Kang SY, Kim MH, Lee WI. [Measurement of inflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis]. *Korean J Lab Med* 2010; 30(3):301-6.
- (211) Nishina N, Kaneko Y, Kameda H, Kuwana M, Takeuchi T. Reduction of plasma IL-6 but not TNF-alpha by methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: a potential biomarker for radiographic progression. *Clin Rheumatol* 2013; 32(11):1661-6.
- (212) Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000; 164(5):2832-8.
- (213) Kuligowska M, Odrowaz-Sypniewska G. Role of interleukin-17 in cartilage and bone destruction in rheumatoid arthritis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2004; 6(2):235-41.
- (214) Zwerina J, Redlich K, Schett G, Smolen JS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051:716-29.
- (215) Gayo A, Mozo L, Suarez A, Tunon A, Lahoz C, Gutierrez C. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998; 85(2):122-30.

(216) Tabardel Y. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. 1996.

(217) Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(9):1960-6.

(218) Bantel H. Critical role of NF-kappaB and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. 2002.

(219) Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8):2834-9.

(220) Kozaci DL. The differential expression of corticosteroid receptor isoforms in corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. 2007.

(221) Braitch M, Harikrishnan S, Robins RA, Nichols C, Fahey AJ, Showe L et al. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009; 119(4):239-45.

(222) de PB, Alperi-Lopez M, Ballina-Garcia FJ, Prado C, Gutierrez C, Suarez A. Cytokines and regulatory T cells in rheumatoid arthritis and their relationship with response to corticosteroids. *J Rheumatol* 2010; 37(12):2502-10.

(223) Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1425-33.

(224) Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(11):1512-7.

(225) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):330-6.

(226) Klunker S, Chong MM, Mantel PY, Palomares O, Bassin C, Ziegler M et al. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 2009; 206(12):2701-15.

(227) Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16(11):1643-56.

(228) Klunker S, Chong MM, Mantel PY, Palomares O, Bassin C, Ziegler M et al. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 2009; 206(12):2701-15.

- (229) Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004; 173(11):6526-31.
- (230) Stary G, Klein I, Bauer W, Koszik F, Reininger B, Kohlhofer S et al. Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF-beta and expand regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 186(1):103-12.
- (231) Bonelli M, von DK, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5):664-71.
- (232) Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(12):987-96.
- (233) Suen JL, Li HT, Jong YJ, Chiang BL, Yen JH. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 127(2):196-205.
- (234) Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(7):1037-40.
- (235) Fransson M, Burman J, Lindqvist C, Atterby C, Fagius J, Loskog A. T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse. *Autoimmunity* 2010; 43(8):590-7.
- (236) Zoka A, Barna G, Somogyi A, Muzes G, Olah A, Al-Aissa Z et al. Extension of the CD4(+)Foxp3(+)CD25(-/low) regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity* 2015; 48(5):289-97.
- (237) Walker MR. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. 2003.
- (238) Yan B, Liu Y. The Nature of Increased Circulating CD4CD25Foxp3 T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis. *Open Rheumatol J* 2009; 3:22-4.
- (239) Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3+. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(11):4091-6.
- (240) Alunno A, Petrillo MG, Nocentini G, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S et al. Characterization of a new regulatory CD4+ T cell subset in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(8):1387-96.

(241) Nocentini G, Alunno A, Petrillo MG, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S et al. Expansion of regulatory GITR+CD25 low/-CD4+ T cells in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(5):444.

(242) Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195(5):603-16.

(243) Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1425-33.

8. ANEXO: INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES

La presente tesis doctoral se presenta en la modalidad de “compendio de publicaciones”. A continuación se detalla el Factor de impacto (FI) de las publicaciones según el Journal Citation Reports del año correspondiente a la publicación en cada una de las revistas:

Artículo 1: *Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-alpha Genotypes in Rheumatoid Arthritis - Association with Clinical Response to Glucocorticoids.*

Banesa de Paz, Mercedes Alperi-López, Francisco J Ballina-García, Catuxa Prado, Lourdes Mozo, Carmen Gutiérrez, Ana Suárez. *The Journal of Rheumatology* 03/2010; 37(3):503-11. DOI:10.3899/jrheum.090566. **Factor de impacto 3.17**

Artículo 2: *Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their Relationship with Response to Corticosteroids.* Banesa de Paz,

Mercedes Alperi-López, Francisco J Ballina-García, Catuxa Prado, Carmen Gutiérrez, Ana Suárez. *The Journal of Rheumatology* 10/2010; 37(12):2502-10. DOI:10.3899/jrheum.100324. **Factor de impacto 3.17**

Artículo 3: *Effects of glucocorticoid treatment on CD25(-)FOXP3(+) population and cytokine-producing cells in rheumatoid arthritis.* Banesa de Paz , Catuxa

Prado , Mercedes Alperi-López , Francisco J Ballina-García , Javier Rodríguez-Carrio , Patricia López, Ana Suárez. *Rheumatology (Oxford, England)* 03/2012; 51(7):1198-207. DOI:10.1093/rheumatology/kes039. **Factor de impacto 4.44**