

SANOFI GENZYME



Sanofi Genzyme y Regeneron están comprometidas en proveer recursos para mejorar la comprensión de la patogénesis de la artritis reumatoide, e investigar en las necesidades no cubiertas de los pacientes que sufren esta enfermedad.

La Nueva y Cambiante Ciencia de la IL-6 en la Artritis Reumatoide

# Los Neutrófilos en la AR y el Papel de la IL-6



**Dr. Leonard H. Calabrese**

Coeditor

Profesor titular de Medicina,  
Cleveland Clinic [Clínica Cleveland]

Cleveland Clinic Lerner College of  
Medicine [Facultad de Medicina  
Lerner de la Cleveland Clinic] de la  
Universidad Case Western Reserve



**Dr. Ernest Choy**

Coeditor

Director de Reumatología  
e Investigación Traslacional

Universidad de Cardiff



Estimados compañeros:

Nos encontramos en un momento muy emocionante en el campo de la artritis reumatoide (AR). Cuanto más sepamos acerca de la patogenia de la AR a partir de la investigación básica y clínica, más preparados estaremos a la hora de entender esta enfermedad. Actualmente sabemos que las citoquinas desempeñan distintas funciones clave en la inflamación que conduce a la AR. Uno de estos ejemplos es la interlequina (IL-6), una citoquina multifuncional que está implicada en la inflamación crónica en pacientes con AR.

Regeneron Pharmaceuticals y Sanofi Genzyme están encantados de poder ofrecerles material formativo adicional en el que se describe parte de la inmunología básica y la patología clínica que observamos en nuestros pacientes con AR, a través de una serie de monografías científicas titulada *La Nueva y Cambiante Ciencia de la IL-6 en la Artritis Reumatoide*. En la primera entrega, repasamos los mecanismos de señalización de la IL-6 que le permiten tener efectos generalizados en la AR. En la segunda entrega, evaluamos las contribuciones de la vía de la IL-6 a la resorción ósea en la AR. En la tercera entrega, examinamos cómo el incremento persistente de la señalización de la IL-6 puede contribuir a las manifestaciones articulares y sistémicas de la AR. En la cuarta entrega, describimos el papel de la IL-6 tanto en la inmunidad innata como en la Adquirida en la AR. En esta entrega, exponemos los efectos de la IL-6 sobre los neutrófilos en la AR.

Esperamos que encuentre esta última entrega informativa e interesante.

Atentamente,

**Dr. Leonard H. Calabrese**

Coeditor

Profesor titular de Medicina, Cleveland Clinic  
Cleveland Clinic Lerner College of Medicine  
de la Universidad Case Western Reserve

**Dr. Ernest Choy**

Coeditor

Director de Reumatología e  
Investigación Traslacional  
Universidad de Cardiff

El Dr. Calabrese y el Dr. Choy percibieron honorarios por sus contribuciones a esta monografía.

# Introducción

La artritis reumatoide (AR) se caracteriza por la activación persistente de las respuestas inmunitarias innata y adquirida, lo cual provoca autoinmunidad, inflamación crónica, destrucción articular y manifestaciones sistémicas, como osteólisis e inducción de la respuesta de fase aguda<sup>1</sup>. La activación del sistema inmunitario en la AR se debe principalmente a un desequilibrio entre las citoquinas pro- y antiinflamatorias que componen la compleja red de señalización entre las células inmunitarias<sup>2</sup>. Por ejemplo, algunas citoquinas como la interleuquina (IL)-6, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF [tumor necrosis factor]- $\alpha$ ), la IL-1 y la IL-17 tienen funciones centrales como efectores proinflamatorios y a menudo se encuentran en abundancia en los pacientes con AR<sup>3-6</sup>. El incremento relativo de la expresión de estos mediadores proinflamatorios, junto con la disminución relativa de mediadores antiinflamatorios como la IL-10 y la IL-11, puede alterar el equilibrio de las citoquinas y generar un ciclo de retroalimentación positiva que perpetúa las condiciones inflamatorias<sup>1,2</sup>. Si bien los factores genéticos y ambientales pueden participar en el desequilibrio de las citoquinas, no existe un único desencadenante conocido que induzca la AR<sup>2</sup>. Por el contrario, tal y como sucede de forma característica en los trastornos autoinmunitarios, el inicio de la enfermedad puede deberse a una reducción de la autotolerancia prolongada en el tiempo, que mantiene el desequilibrio de las citoquinas y contribuye a provocar un ciclo de afecciones inflamatorias progresivas y, finalmente, crónicas<sup>1</sup>.

Una citoquina proinflamatoria de especial interés en la patogenia de la AR es la IL-6, que interactúa con prácticamente todas las células de las ramas innata y adquirida del sistema inmunitario a través de su versátil mecanismo de señalización, el cual se ha examinado en una monografía anterior titulada *Las Funciones de la IL-6 en la inmunidad innata y adquirida en la AR*<sup>7,8</sup>. En la

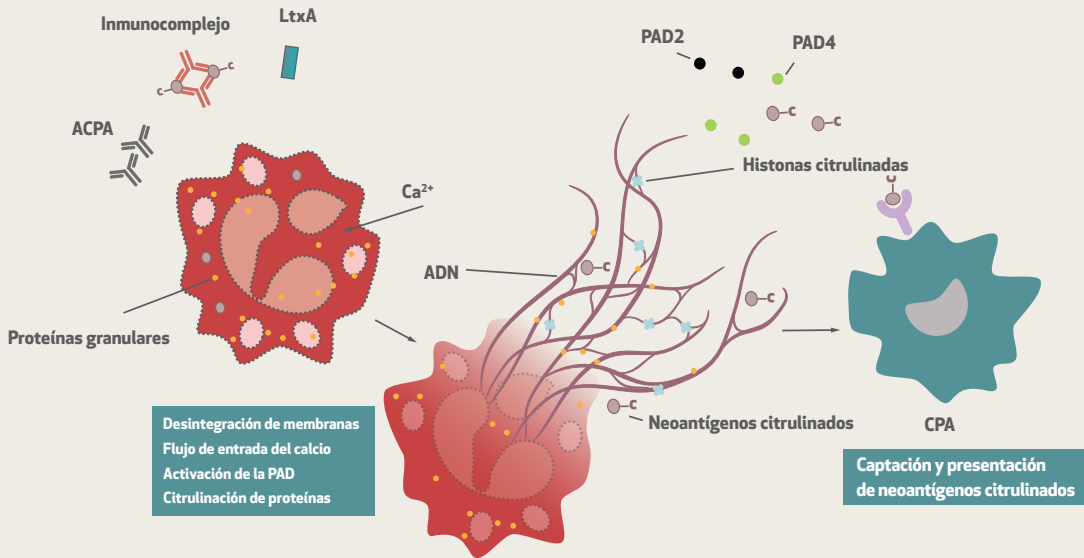
AR, el incremento persistente de la señalización de la IL-6 contribuye de forma significativa a la inflamación crónica, desencadenando varios procesos dentro de los sistemas inmunitarios innato y adquirido, y perpetuando las interacciones entre ambos<sup>7,9</sup>. Entre las células del sistema inmunitario innato sobre las que la IL-6 ejerce una gran influencia se encuentran los neutrófilos (las primeras células que llegan a los focos de infección e inflamación)<sup>7,10</sup>. Los neutrófilos han sido identificados durante mucho tiempo como componentes esenciales de la defensa del hospedador; de hecho, la identificación y la destrucción de microbios patógenos se encuentran entre sus funciones principales<sup>11</sup>. No obstante, un conjunto de datos cada vez mayor que señalan la complejidad de los neutrófilos ha permitido conocer mejor sus funciones más allá de la protección frente a los microbios patógenos<sup>12</sup>. En la actualidad, se acepta que la población de neutrófilos puede estar constituida por varios subconjuntos con diversas funciones y activación diferencial, según el estímulo y el microambiente, y que estas células podrían tener diferentes funciones, entre otras, la inmunovigilancia, la regulación de la inmunidad adquirida, la cicatrización de heridas, el inicio y el mantenimiento de la inflamación, y la tolerancia inmunitaria<sup>4,13,14</sup>. El papel de los neutrófilos en estos procesos se ha convertido en un tema de gran interés, principalmente porque la “desaparición de la tolerancia” a los autoantígenos constituye un acontecimiento determinante en la aparición de enfermedades autoinmunitarias como la AR, y la naturaleza tóxica del contenido celular de los neutrófilos puede contribuir de forma notable al daño tisular y al desarrollo de una inflamación crónica<sup>4,10,15,16</sup>. En la presente monografía se describirán en mayor detalle los neutrófilos y el papel que desempeña la IL-6 en la inducción de su comportamiento patógeno en la AR.

# Los neutrófilos en las características anatomopatológicas de la AR: Autoanticuerpos

Uno de los signos distintivos de la autoinmunidad es la producción de autoanticuerpos. En la mayoría de los pacientes con AR, se detectan inmunocomplejos autorreactivos de inmunoglobulina (Ig)M e IgG y factor reumatoide (FR), así como anticuerpos contra proteínas citrulinadas (*anticitrullinated protein antibodies*, ACPA)<sup>21,10</sup>. Los ACPA, presentes en aproximadamente el 70 % de la población de pacientes con AR, se consideran un marcador de enfermedad agresiva y erosiva y a menudo se detectan antes de la aparición de los síntomas, lo cual deja entrever que están implicados en promover la progresión de la enfermedad<sup>17-20</sup>. Los ACPA se dirigen preferentemente a epítomos con residuos modificados (citrulinados) después de la traducción (es decir, proteínas hipercitrulinadas), muchos de los cuales ya han sido identificados. No obstante, aún queda por dilucidar su origen y la función específica en la respuesta patogénica de los ACPA. Se ha sugerido que los neutrófilos son una posible fuente de estos neoantígenos hipercitrulinados, que pueden salir al espacio extracelular como parte de estructuras únicas denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NET)<sup>10</sup>.

## Las NET autoinmunitarias como fuente de autoantígenos

Las NET se liberan durante un proceso denominado netosis, una forma de muerte celular distinta de la apoptosis y la necrosis, en la que el contenido granular y citosólico de la célula sale al espacio extracelular junto con la cromatina descondensada y otros materiales del núcleo (**Figura 1**)<sup>10</sup>. Las NET fueron descritas originalmente como una estrategia empleada por los neutrófilos para inmovilizar y eliminar a los microbios patógenos invasores; estudios recientes han revelado que una gama más amplia de estímulos (como las especies reactivas del oxígeno [*reactive oxygen species*, ROS], los anticuerpos y complejos inmunitarios, y ciertos factores genéticos o ambientales) pueden inducir la formación de NET<sup>21-26</sup>. Los datos obtenidos a partir de las investigaciones realizadas apuntan a que el contenido de una NET particular podría depender del estímulo específico. Por ejemplo, una diferencia notable entre las NET inducidas por microbios patógenos y las NET asociadas a la autoinmunidad es la presencia de proteínas hipercitrulinadas en estas últimas, pero no en las primeras (**Figura 1**)<sup>27</sup>. Estas y otras observaciones han contribuido a un campo de investigación en rápida evolución en el que se están explorando los mecanismos exactos de liberación de NET y de muerte celular neutrófila; el campo daría la bienvenida a un nuevo léxico que hace distinciones entre las diversas formas del proceso de netosis. En la presente monografía, empleamos el término “NET autoinmunitarias” para describir aquellas que son desencadenadas por los estímulos relacionados con la AR. La investigación en este campo está avanzando rápidamente, y estudios destacados realizados hasta la fecha apuntan a que ciertos factores que contribuyen a la aparición de la AR podrían estar relacionados con su capacidad de estimular específicamente la formación de NET autoinmunitarias<sup>28</sup>.



**Figura 1. Modelo de liberación de NET autoinmunitaria<sup>10,24,38,39</sup>.** La formación de NET autoinmunitarias puede ser iniciada por estímulos externos como inmunocomplejos, ACPA o toxinas bacterianas (p. ej., LtxA). El flujo de entrada del calcio produce la activación de las enzimas PAD, que catalizan la citrulinación de los residuos de arginina en las histonas y otras proteínas intracelulares. Como resultado de la pérdida de la carga positiva de las histonas, la cromatina se descondensa y la desintegración de las membranas intracelulares permite la mezcla del contenido granular con el ADN, con otros materiales del núcleo y con los neoantígenos citrulinados. Al romperse la membrana plasmática, este contenido, junto con la PAD2 y la PAD4 activadas, es liberado, ya sea fijado al armazón de cromatina (como NET) o en forma de moléculas transportadas por difusión, y proporciona una fuente de autoantígenos para la captación y presentación por parte de las CPA.

Varias líneas de investigación respaldan la participación de los neutrófilos y las NET en la patogenia de la AR. Los neutrófilos son las células más abundantes del líquido sinovial en la AR, y cuando son aislados a partir de líquido sinovial o sangre periférica de pacientes con AR, se ha demostrado que experimentan una forma de netosis incluso en ausencia de estímulos externos<sup>10,24</sup>. Se ha observado una correlación positiva entre el porcentaje de neutrófilos formadores de NET y los títulos elevados de ACPA, lo cual posiblemente indique un fenotipo de enfermedad más agresiva. Es más, en experimentos de cocultivo, las NET obtenidas de neutrófilos sinoviales de pacientes con AR fueron capaces de activar los sinoviocitos tipo fibroblasto (STF) y de incrementar de manera significativa la expresión del ARNm y la síntesis de proteínas de moléculas proinflamatorias clave, como la

IL-6 y la IL-8<sup>24</sup>. Dada la implicación demostrada de los STF en la mediación del daño tisular en la AR, estas observaciones denotan que las NET tienen una función patogénica en las articulaciones con AR.

Además de intervenir en el surgimiento de efectos locales, los neutrófilos formadores de NET podrían contribuir a causar algunas de las manifestaciones sistémicas que se observan en la AR. Por ejemplo, se ha detectado una relación entre el grado de netosis en la sangre periférica de los pacientes con AR y los marcadores de inflamación sistémica, como una elevación de la concentración sérica de proteína C-reactiva (PCR) y de IL-17 y una mayor velocidad de eritrosedimentación (VSG)<sup>24</sup>. Las NET también se han detectado en nódulos reumatoides y en la piel de pacientes con dermatosis neutrófila concomitante, una manifestación cutánea de la

AR<sup>24,29</sup>. Se han identificado varios vínculos entre las NET y la trombosis: las NET pueden servir de andamiaje estructural para la formación de trombos, y se sabe que la cromatina y las histonas inician la coagulación<sup>30-32</sup>. Asimismo, la elastasa de neutrófilos y la catepsina G, proteínas relacionadas con las NET, potencian la trombogénesis a través de la degradación de los anticoagulantes endógenos<sup>33</sup>. Por último, las NET pueden expresar altos niveles de factor tisular, que activa la cascada de coagulación localmente<sup>31</sup>. Dada la posible intervención de los neutrófilos y las NET en los mecanismos de coagulación, cabe suponer que la activación excesiva de neutrófilos y el incremento de la formación de NET podrían estar relacionados con un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares (CV)<sup>34-36</sup>. Estas observaciones respaldan la amplia participación de los neutrófilos no solo en la propagación de respuestas locales y articulares, sino también en la regulación sistémica de los diversos componentes de las respuestas inflamatoria e inmunitaria, y en la intervención en procesos tan diversos como la hematopoyesis, la angiogénesis y la fibrogénesis<sup>37</sup>.

## Generación de neoantígenos hipercitrulinados

La formación de NET autoinmunitarias parece estar iniciada por la citrulinación de histonas, la cual está catalizada por la PAD4, una isoforma de la familia de las peptidil-arginina deiminasas (PAD), enzimas cuya actividad está regulada en parte por el flujo de calcio. La PAD4 y otras isoformas de PAD también citrulinan otras proteínas, algunas de las cuales constituyen dianas de los ACPA<sup>39</sup>. Dada la temprana asociación entre los ACPA y la AR, han surgido varias teorías interesantes sobre las PAD que quizá ayuden a explicar las conexiones entre ciertos factores genéticos, ambientales y patógenos, y la aparición de la AR. Por ejemplo, la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) C1858T en *PTPN22*, un gen que codifica una tirosina-fosfatasa que inhibe la actividad de la PAD4, comporta un riesgo elevado de padecer AR, con una oportunidad relativa (OR) de 1,5-2. Cuando el epítipo compartido (EC) del alelo de predisposición genética HLA (*human leukocyte antigen* [antígeno leucocitario humano])-DRB1 también está presente, el SNP C1858T aumenta el riesgo de AR en 20-30 veces y esta sinergia se limita principalmente a la población de pacientes con AR y ACPA. Se ha sugerido que el SNP C1858T aumenta el riesgo de AR porque reduce la capacidad de *PTPN22* para unirse físicamente a la PAD4 e inhibir su actividad, lo cual resultaría en un incremento de la citrulinación de proteínas y la formación de NET<sup>40</sup>. En un estudio aparte, se observó que un haplotipo de propensión a la AR del gen *PADI4* estabilizó los transcritos de la PAD4 de neutrófilos y se asoció a títulos elevados de ACPA en las muestras de suero de pacientes con AR<sup>41</sup>. Otro grupo observó que los anticuerpos con reactividad cruzada frente a PAD3/PAD4 fueron capaces de incrementar la eficiencia de la PAD4 aumentando su sensibilidad al calcio. De acuerdo con los autores, estos datos son indicativos de



un ciclo de retroalimentación (feed-forward) para la generación de autoantígenos citrulinados que podría impulsar la progresión de la enfermedad y, de hecho, los pacientes con AR que tenían estos autoanticuerpos fueron más propensos a presentar daño radiográfico<sup>42</sup>.

El factor ambiental de riesgo de AR más ampliamente reconocido es el tabaquismo, y los pacientes que fuman tienen una mayor concentración de PAD2 activada y de proteínas citrulinadas en las células del lavado broncoalveolar que los no fumadores<sup>1,43</sup>. Aunque se ha demostrado que la nicotina puede unirse a los receptores de acetilcolina de los neutrófilos e inducir una vía similar a la netosis, apenas hay datos que definan el impacto del tabaquismo sobre los neutrófilos en la AR<sup>44</sup>. Se ha formulado la hipótesis de que existe un vínculo más directo entre los neoantígenos hipercitrulinados asociados a los neutrófilos y el desarrollo de la AR en el contexto de la periodontitis, la cual se ha revelado como un fuerte factor de riesgo de AR. La exposición a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), una bacteria facultativa gramnegativa que se encuentra a menudo en el microbioma oral de los pacientes con periodontitis, está relacionada con la concentración de ACPA y del FR, especialmente en presencia del alelo de predisposición HLA-DRB1-EC. Los neutrófilos expuestos a *Aa* liberaron NET con patrones de hipercitrulinación de proteínas dependiente de calcio y de PAD, que fueron similares a los de las NET aisladas del líquido sinovial de pacientes con AR. Se ha mostrado que en el mecanismo de formación de NET inducido por *Aa* está implicada la leucotoxina A (LtxA), un factor de virulencia formador de poros que se une a la subunidad  $\beta 2$  del receptor tipo integrina de los neutrófilos para provocar la permeabilización de la membrana, el flujo de entrada del calcio y la activación de la PAD4<sup>38</sup>. Estos datos respaldan la importancia de los neutrófilos (y del microbioma)

en la patogenia de la AR y apuntan a las NET como posible fuente de neoantígenos que impulsan la generación de ACPA.

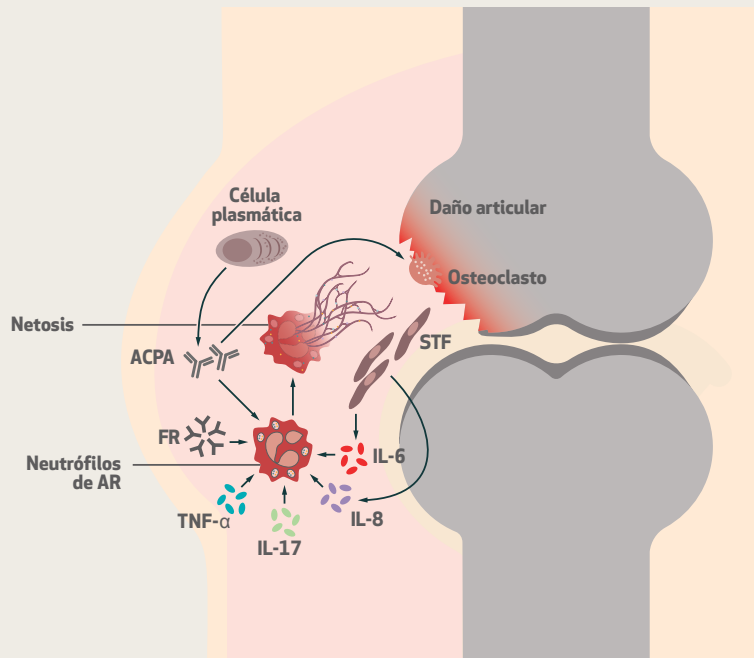
## NET y generación de ACPA

Los pacientes que portan ciertos alelos de predisposición del epítipo compartido de HLA-DR presentan una gran predisposición a padecer AR con ACPA positivos<sup>45</sup>. Esta asociación podría deberse a un incremento de la afinidad de la hendidura de unión P4 del HLA a los péptidos citrulinados, lo que podría conducir a una gran densidad de presentación del complejo HLA-péptido en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) que permitiría la activación de los linfocitos T<sup>45,46</sup>. Sin embargo, si bien las teorías predominantes sobre la asociación entre los ACPA y la predisposición genética según el HLA se basan en las capacidades de presentación de antígenos de las moléculas de HLA, los datos definitivos sobre los mecanismos exactos que conducen a la generación de ACPA siguen siendo difíciles de obtener<sup>47,48</sup>. En la AR, los ACPA van dirigidos a las formas citrulinadas de determinadas proteínas, como la vimentina, la antitrombina, el fibrinógeno y la  $\alpha$ -enolasa, que se encuentran inmovilizadas dentro de las NET<sup>24,39,49</sup>. Es importante destacar que algunas de estas proteínas citrulinadas, así como las formas activadas de la PAD2 y la PAD4, pueden liberarse asimismo durante la netosis en forma de moléculas transportadas por difusión (**Figura 1**)<sup>39</sup>. Estas enzimas PAD solubles podrían contribuir aún más a la generación de autoantígenos mediante la citrulinación de proteínas que se encuentran principalmente en el espacio extracelular sinovial (p. ej., fibrinógeno y colágeno)<sup>39</sup>.

Es interesante mencionar que los ACPA podrían promover de forma indirecta su propia síntesis, mediante la inducción de la formación de NET. Las

**Figura 2. Mecanismos de retroalimentación (feed-forward) de formación de neoantígenos, autorreactividad e inflamación en la AR<sup>24,39,50,60</sup>.**

Las citoquinas proinflamatorias, los inmunocomplejos, los ACPA y otros factores pueden influir en la liberación de NET en la AR. Es posible que las NET autoinmunitarias aporten una fuente de autoantígenos que pueden desencadenar la producción de ACPA por parte de las células plasmáticas, lo cual induciría aún más la liberación de NET y contribuiría a la formación de osteoclastos y a la resorción ósea. Las NET también estimulan la secreción de IL-6 y otras citoquinas por parte de los STF, lo cual favorece el daño tisular e induce aún más la formación de NET.



fracciones de IgG e IgM aisladas del líquido sinovial y de la sangre periférica de pacientes con AR, pero no de los controles sanos, indujeron de forma notable la netosis en los neutrófilos en cultivo; los anticuerpos contra la vimentina citrulinada también indujeron la formación de NET<sup>24</sup>. Por tanto, es posible que exista un mecanismo patogénico perpetuo en la AR, en el que los neutrófilos son esenciales en el ciclo de formación de neoantígenos, en la autorreactividad y en la inflamación que conducen a la destrucción articular (**Figura 2**).

## Regulación de la formación de NET mediada por IL-6

Debido a las dificultades inherentes a la investigación con neutrófilos humanos, los datos definitivos que respaldan la regulación directa de las NET son limitados. Sin embargo, hay abundantes datos obtenidos de forma directa o indirecta que implican a la IL-6 en múltiples procesos de los neutrófilos, entre otros, diferenciación, migración, activación, apoptosis y, más recientemente, emisión de NET<sup>6,7,50</sup>. En concreto, en neutrófilos aislados de voluntarios sanos, la señalización autocrina de IL-6 provocó la formación de NET a un nivel comparable al inducido por los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos<sup>50</sup>. En un estudio se detectó que la atenuación de las señales de la IL-6 redujo la tendencia de los neutrófilos de pacientes con AR a liberar NET, posiblemente debido al papel clave de la IL-6 en la expresión de la elastasa de neutrófilos

y la mieloperoxidasa (MPO), ambas moléculas inductoras de NET<sup>51</sup>. La IL-6 también podría intervenir de forma indirecta en la regulación de la concentración de calcio intracelular, lo cual influye en la actividad de la PAD: los neutrófilos de voluntarios sanos estimulados con IL-6 *in vitro* produjeron una elevada concentración de factor activador de plaquetas (FAP), lo cual estuvo relacionado con un aumento del calcio citosólico<sup>52</sup>.

Un aspecto subyacente de las características anatomopatológicas de la AR es la inducción de ciclos de retroalimentación que pueden perpetuar o amplificar las respuestas inflamatorias<sup>1</sup>. Es posible que las NET formen parte de estos ciclos, dada su capacidad de influir en la activación de los STF y, potencialmente, de linfocitos T y B; la IL-6 podría cooperar con las NET a través de sus acciones sobre tipos celulares similares. Por ejemplo, la IL-6 induce la maduración de linfocitos B a células plasmáticas capaces de secretar ACPA que, a continuación, podrían inducir la liberación de NET<sup>6,8,24,53</sup>. En un estudio se observó que las NET estimulan la producción de IL-6 en los STF obtenidos de pacientes con AR; sin embargo, en otro estudio, la IL-6 indujo la formación de NET en neutrófilos de voluntarios sanos *in vitro*<sup>24,50</sup>. Por tanto, es posible que la IL-6 actúe como mensajero entre los neutrófilos y otros efectores del mecanismo patogénico de la AR y que faciliten los ciclos de retroalimentación destructivos que conducen a la progresión de la enfermedad (**Figure 2**).

## Regulación del tráfico de neutrófilos y citotoxicidad en la AR

Los neutrófilos se producen en la médula ósea y, en condiciones normales, se mantiene una concentración constante de células en la circulación y en el “compartimento marginal”, que es un reservorio de neutrófilos que viajan lentamente a través de la médula ósea, el hígado, el bazo y los pulmones<sup>14,54</sup>. Los neutrófilos circulantes son, por lo general, inactivos, pero pueden activarse rápidamente en respuesta a señales procedentes del revestimiento endotelial de la pared vascular o a la presencia de microbios patógenos<sup>55</sup>. Estas señales pueden desencadenar una extravasación, es decir, una salida de los neutrófilos de la vasculatura hacia el tejido circundante<sup>3</sup>. Un signo distintivo de la AR es el aumento del número de neutrófilos circulantes, acompañado de una afluencia de neutrófilos desde la circulación hacia la membrana sinovial, donde intervienen en la inflamación localizada y el daño tisular<sup>10</sup>.

### Concentración y localización de neutrófilos

Los neutrófilos tienen una semivida relativamente breve, ya que permanecen en circulación durante 24 horas antes de la apoptosis y, por tanto, la generación continua de neutrófilos en la médula ósea es necesaria para mantener un estado de equilibrio<sup>10,14</sup>.

Se ha mostrado que la IL-6 aumenta el flujo de salida de neutrófilos desde la médula ósea y también puede causar un cambio rápido en la localización de los neutrófilos desde el compartimento marginal al circulante<sup>56,57</sup>. Por consiguiente, el notable incremento de la expresión de IL-6 observado en los pacientes con AR podría explicar en parte la neutrofilia que a menudo va asociada a la AR. El papel de la IL-6 en la regulación del número de neutrófilos viene ejemplificado de manera adicional mediante estudios que han mostrado que la disminución de la señalización de IL-6 anuló los aumentos del recuento de neutrófilos; se ha formulado la hipótesis de que este resultado podría deberse a una inversión de la localización (esto es, desde la circulación hacia el compartimento marginal de la médula ósea)<sup>58</sup>. Esta teoría es muy diferente a lo que se conoce sobre la neutropenia febril en la mielosupresión, en la que los efectos citotóxicos de la quimioterapia afectan a la producción de neutrófilos en la médula ósea<sup>59</sup>. En consonancia con la hipótesis del compartimento marginal de la médula ósea, una disminución de la señalización de IL-6 se ha relacionado con neutropenia transitoria; sin embargo, los experimentos *ex vivo* no han revelado ningún efecto sobre los mecanismos de defensa frente a microbios patógenos (p. ej., fagocitosis y producción de ROS)<sup>57</sup>.

## Migración de neutrófilos

Aparte del aumento de la cantidad de neutrófilos circulantes, la AR se caracteriza por un incremento sustancial de la migración de neutrófilos al espacio articular<sup>55</sup>. Los mecanismos que causan la trans migración de los neutrófilos desde la circulación hacia los tejidos se han estudiado en profundidad<sup>13</sup>. En situaciones de inflamación, lesión o infección, las células mononucleares del interior de los tejidos afectados se activan y liberan mediadores proinflamatorios como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor* [GM-CSF]),

TNF- $\alpha$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ <sup>61,62</sup>. Estas citoquinas activan el endotelio vascular, incrementan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular e inducen la producción de quimiocinas como la IL-8<sup>13,55,63</sup>. Las concentraciones relativamente altas de estas quimiocinas actúan como gradientes quimiotácticos que atraen a los neutrófilos circulantes hacia el área afectada<sup>64</sup>. Las moléculas de adhesión expresadas en los neutrófilos reclutados (p. ej., CD62L) interactúan con las del endotelio activado y promueven la marginación seguida de la adhesión firme y la transmigración fuera de la circulación<sup>11,55</sup>. A continuación, los neutrófilos que han transmigrado se dirigen a los sitios de inflamación a través del gradiente quimiotáctico que puede ser establecido por productos bacterianos, como *N*-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) y LPS, componentes del complemento, o quimiocinas como la IL-8<sup>13,55</sup>. Cabe destacar que la IL-8 es sintetizada en grandes cantidades por los STF activados mediante IL-6 en las articulaciones de los pacientes con AR, y se ha descubierto que, *in vitro*, la IL-6 aumenta la migración de neutrófilos hacia la IL-8<sup>57,63</sup>. Además, los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* indican que la IL-6 podría inhibir la marginación de los neutrófilos al reducir la expresión de CD162 en los neutrófilos circulantes, en parte mediante el incremento de la producción de IL-8<sup>65</sup>. Por el contrario, se ha mostrado que la IL-6 *in vitro* mejora la adhesión a las células endoteliales de una manera dependiente de la dosis y que la supresión de la señalización de IL-6 en modelos animales de artritis inducida por colágeno (AIC) redujo la migración de los neutrófilos hacia las articulaciones inflamadas<sup>66,67</sup>. Si bien estos datos parecen incoherentes por el papel de la IL-6 en la supresión de la marginación de neutrófilos, otros factores presentes en la articulación con patología reumatoide podrían compensar la supresión de CD162 inducida por IL-6/IL-8 y posiblemente mantener así un ambiente local que permita la adhesión y la transmigración. De hecho, en experimentos *in vitro* se

ha mostrado que la supresión de la IL-6 no tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión de otras moléculas de adhesión de neutrófilos como CD11b, CD18 y L-selectina<sup>57</sup>.

## Citotoxicidad de los neutrófilos

Los neutrófilos pueden causar daño tisular extenso debido a la liberación de gránulos citotóxicos que contienen ROS, intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN), enzimas proteolíticas como gelatinasa y elastasa, metaloproteasas y otras moléculas que dañan los tejidos<sup>10,68,69</sup>. La desgranulación es inducida por varios factores desencadenantes, entre otros: productos bacterianos o proteínas víricas que son reconocidos por receptores tipo toll (*toll-like receptors*, TLR); microbios patógenos opsonizados u otras partículas extrañas que son reconocidos por receptores del complemento; inmunocomplejos de IgG que son reconocidos por receptores Fcγ (RFcγ); o citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que son reconocidas por sus receptores específicos<sup>55,70,71</sup>. En individuos sanos, estas interacciones inician una cascada de sucesos que incluyen la inducción del estallido oxidativo y la posterior liberación de moléculas citotóxicas en concentraciones bajas, que ayudan a contener y resolver el estímulo iniciador (p. ej., infección)<sup>68</sup>. Sin embargo, en la AR, la desgranulación excesiva de neutrófilos es frecuente y la liberación asociada de grandes cantidades de toxinas contribuye a provocar un daño tisular sustancial<sup>70</sup>.

El estrés oxidativo iniciado durante la desgranulación y definido por una producción de ROS que excede la capacidad de neutralización de la célula puede causar efectos perjudiciales, por ejemplo, daños al tejido circundante y disfunción endotelial (aumento de la permeabilidad vascular, resistencia a la insulina y trombosis), y amplificar la cascada inflamatoria<sup>68,72,73</sup>. En la AR, se han detectado grandes cantidades de ROS en el líquido sinovial de las articulaciones

inflamadas<sup>74</sup>. Las ROS también puede iniciar la liberación de NET y el proceso de netosis<sup>21</sup>. Las citoquinas pueden influir en la inducción del estrés oxidativo, aunque el resultado específico depende del estímulo. Por ejemplo, el TNF-α, el GM-CSF y la IL-8 pueden cebar a los neutrófilos de sangre completa para generar peróxido de hidrógeno en respuesta a la fMLP bacteriana, mientras que la IL-1α, IL-1β e IL-6 no indujeron una respuesta de estrés oxidativo<sup>75</sup>. Por el contrario, se ha observado que la IL-6 incrementa de forma significativa la producción de ROS por los STF del líquido sinovial de pacientes con AR<sup>61</sup>. Estudios recientes han mostrado que al anular la señalización de IL-6 se podría reducir la cantidad de marcadores de estrés oxidativo en los pacientes con AR en comparación con los controles<sup>76</sup>.

En los casos de inflamación crónica, el umbral para la activación de neutrófilos puede ser menor que en los individuos sanos y, de hecho, los perfiles de activación de neutrófilos en los pacientes con AR son distintos de los de los controles no afectados<sup>4</sup>. Por ejemplo, en comparación con los controles sanos, los neutrófilos circulantes de los pacientes con AR exhiben un fenotipo activado: con un mayor potencial quimiotáctico debido al incremento de la expresión del receptor de quimiocinas CC tipo 2 (C-C *chemokine receptor 2*, CCR2), con una mayor capacidad de fagocitosis y con una mayor expresión del RFcγ<sup>4,77,78</sup>. En la AR, un factor fundamental para la activación de los neutrófilos es el reconocimiento por parte del RFcγ de inmunocomplejos IgG-FR o IgM-FR, que se encuentran en abundancia en forma de depósitos en el interior del tejido sinovial y en la superficie del cartílago articular, o en forma de complejos solubles en el líquido sinovial<sup>79,80</sup>. La endocitosis de inmunocomplejos solubles mediada por el RFcγ puede desencadenar la desgranulación de neutrófilos, la formación de NET y la netosis<sup>81</sup>. Asimismo, los inmunocomplejos depositados pueden inducir una “fagocitosis frustrada”, o la formación incompleta de vesículas fagocíticas, que induce a

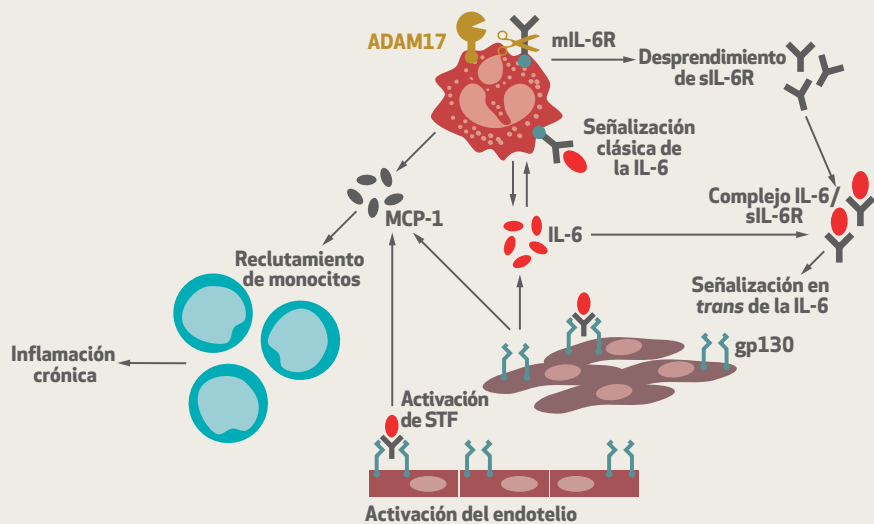
los neutrófilos a liberar concentraciones elevadas de proteasas, ROS y otros agentes citotóxicos directamente sobre la superficie del cartílago articular<sup>4,10</sup>.

## Regulación por IL-6 de la inflamación mediada por neutrófilos

La mayor concentración de IL-6 observada en el líquido sinovial de los pacientes con AR puede causar una mayor afluencia de neutrófilos a la articulación<sup>55</sup>. Mientras que la salida de los neutrófilos de la vasculatura por lo general no se considera un proceso tóxico, la infiltración rápida e intensa de los neutrófilos en la membrana

sinovial provoca una lesión aguda y una inflamación patológica<sup>11</sup>. Los neutrófilos y la IL-6 también colaboran para mantener la inflamación mediante el establecimiento de ciclos de retroalimentación positiva: los neutrófilos activados son una fuente importante de IL-6, que actúa de manera autocrina o paracrina para fomentar aún más la señalización proinflamatoria (**Figura 3**). Es más, los neutrófilos pueden afectar a la señalización de IL-6 mediante un proceso denominado “desprendimiento”<sup>10</sup>. En este, el receptor de IL-6 anclado a la membrana (*membrane-bound IL-6 receptor*, mIL-6R) se escinde de la superficie celular por la acción del dominio catalítico de la metaloproteasa ADAM17 (ADAM17) para producir el IL-6R soluble (sIL-6R)<sup>8,82</sup>. La IL-6 se une con una afinidad similar a la membrana y a las formas solubles de su receptor, y los complejos citoquina-receptor soluble o citoquina-receptor anclado a membrana se pueden asociar con la glicoproteína 130 unida a la membrana (gp130) para iniciar la señalización intracelular<sup>8,83,84</sup>. La señalización clásica o en *cis* se transmite solo en las células que expresan mIL-6 (principalmente

**Figura 3. Los mecanismos de señalización de la IL-6 inician los ciclos de retroalimentación proinflamatorios en la AR<sup>8,10,85,88</sup>.** En los neutrófilos activados, el receptor de IL-6 anclado a la membrana se escinde por la acción de metaloproteasas como la ADAM17, de manera que se libera una forma soluble del receptor que se une a la IL-6 y desencadena el proceso de señalización en *trans* en las células que expresan gp130, por ejemplo, STF y células endoteliales. A su vez, los STF activados liberan IL-6, que puede activar más neutrófilos y otras células inmunitarias a través de la señalización clásica e iniciar un ciclo de retroalimentación positiva de señalización proinflamatoria. Los neutrófilos, STF y células endoteliales activados producen MCP-1, que recluta monocitos hacia el espacio sinovial e inicia de este modo la transición de la inflamación de aguda a crónica.



leucocitos y hepatocitos), mientras que la señalización en *trans* a través de IL-6/sIL-6R puede ocurrir en prácticamente cualquier tipo de célula con expresión de gp130 ubicua, incluidas aquellas sin expresión constitutiva del mL-6R<sup>83,85</sup>.

## Inicio de la resolución inflamatoria

En condiciones normales, la inflamación aguda se controla rápidamente, ya que el proceso de eliminación de los estímulos nocivos finaliza en cuestión de días y desencadena mecanismos para resolver por completo la inflamación así como cualquier daño asociado<sup>86</sup>. Este proceso se logra en parte a través de la señalización de IL-6 en *trans* y la autodestrucción de neutrófilos. En primer lugar, los neutrófilos circulantes son reclutados hacia los focos de inflamación por factores secretados por las células endoteliales activadas, como la IL-8<sup>85,87</sup>. La IL-8 induce la escisión del IL-6R de la superficie de los neutrófilos, lo que permite la señalización de IL-6 en *trans* en las células del estroma, los STF y las células endoteliales<sup>7,87-89</sup>. El resultado es una disminución de la expresión de las quimiocinas que atraen a los neutrófilos (como la IL-8) y un aumento de las quimiocinas que atraen a monocitos, en concreto, la proteína quimiotáctica para monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1) y el ligando de quimiocina 8 (*chemokine ligand 8*, CCL8), de manera que se suprime aún más la acumulación de neutrófilos y se inicia el reclutamiento de monocitos. En individuos sanos, este cambio en el reclutamiento celular inicia la resolución inflamatoria: los neutrófilos acumulados envejecen y experimentan apoptosis o muerte celular inducida por fagocitosis, después de la eliminación de los microbios patógenos invasores u otras partículas extrañas<sup>85,88</sup>. Los neutrófilos apoptóticos también liberan IL-6R, facilitando aún más la señalización en *trans* en las células somáticas proximales y potenciando el reclutamiento de monocitos<sup>85</sup>. La señalización de IL-6 en *cis* aumenta la expresión

del factor estimulante de colonias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) en la superficie de los monocitos reclutados, lo cual promueve su diferenciación en macrófagos fagocíticos que ingieren los neutrófilos apoptóticos, un proceso denominado eferocitosis<sup>90,91</sup>. El proceso de eferocitosis desencadena la producción por parte de macrófagos de mediadores antiinflamatorios como TGF- $\beta$  e IL-10, que a su vez inicia cascadas de señalización que reducen eficazmente la respuesta inflamatoria y, en última instancia, provocan la resolución de la inflamación<sup>92-94</sup>.

La eliminación de los neutrófilos apoptóticos es fundamental para resolver el proceso inflamatorio y, de hecho, cualquier defecto en la eliminación de las células apoptóticas y sus residuos asociados a menudo conduce a la inducción de estados inflamatorios o a la progresión de estos<sup>10,94-96</sup>. En el caso de una eferocitosis inadecuada o incompleta, los neutrófilos apoptóticos experimentan una necrosis secundaria, definida por la pérdida de integridad de la membrana y la posterior filtración al espacio extracelular del contenido celular, incluidos los mediadores inflamatorios<sup>91</sup>. Los mecanismos de eferocitosis parecen estar en su mayoría intactos en los pacientes con AR confirmada y las NET también pueden resolverse de manera eficaz<sup>97</sup>. Los estudios en modelos animales han mostrado que las deficiencias en la eliminación de los residuos apoptóticos pueden causar una poliartritis crónica que se asemeja a la AR humana<sup>98,99</sup>. Los estudios también apuntan a que los mayores efectos inflamatorios de los neutrófilos en la AR pueden deberse a la ampliación anómala de su periodo de vida, a consecuencia de la desregulación de las vías de inducción de la apoptosis, tal y como se describe en la siguiente sección.

## La función de la IL-6 en la apoptosis de los neutrófilos

Como parte de la respuesta normal de activación de neutrófilos, estos reciben señales antiapoptóticas que confieren a la respuesta inmunitaria innata tiempo suficiente para contener una infección mientras se genera una respuesta adquirida apropiada (generalmente de 4 a 7 días); los defectos en las vías que promueven la supervivencia provocan sensibilidad a determinadas infecciones<sup>100</sup>. Varias líneas de investigación apuntan a que en la AR, tanto los neutrófilos sinoviales como los circulantes experimentan una demora aún mayor de la apoptosis que podría aumentar la probabilidad de inflamación persistente y daño a los tejidos y las células del hospedador<sup>10,101</sup>. No se han definido en su totalidad las funciones de las citoquinas en la prolongación de la supervivencia de los neutrófilos, sin embargo, se ha mostrado que la IL-6 puede incrementar aún más la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1, cuya concentración ya es elevada debido a la expresión constitutiva, en los STF asociados a la AR. Esta concentración es mantenida por la señalización de GM-CSF, que a su vez es inducible por la IL-6<sup>62,101-103</sup>. Asimismo, en experimentos *ex vivo* con neutrófilos de seres humanos sanos, la IL-6 indujo la liberación del FAP que, junto con la estimulación de la IL-6, demora la apoptosis de los neutrófilos<sup>52</sup>. También se ha sugerido que la IL-6 es la señal proinflamatoria exclusiva cuya función prolonga la supervivencia de los neutrófilos en los pacientes con osteomielitis, una infección ósea crónica<sup>104</sup>.

Estudios *in vitro* permiten suponer que los efectos específicos de la IL-6 sobre la apoptosis de neutrófilos dependen del microambiente. Por ejemplo, el ambiente hipóxico de la membrana sinovial podría promover la supervivencia de los neutrófilos, ya que los neutrófilos de individuos sanos incubados con líquido sinovial de pacientes con AR en condiciones de hipoxia exhibieron un

periodo de vida superior al de los cultivados en un ambiente oxigenado<sup>101</sup>. Es interesante el hecho de que la disminución de la señalización de IL-6 se asociara a una menor supervivencia de los neutrófilos y a la actividad oxidativa y fagocítica de estos, cuando se examinaron en condiciones hipóxicas como las observadas en las articulaciones inflamadas de la AR<sup>105</sup>. Es posible que los efectos de la IL-6 dependan de la concentración de neutrófilos y de su estado de activación, los cuales difieren entre los estados patológicos y saludables<sup>52,106-109</sup>. De hecho, en un estudio se descubrió que, en presencia de IL-6, una mayor proporción de neutrófilos sobrevivía al cultivarlos con una mayor densidad<sup>55,106</sup>. Ciertamente, la IL-6 no retrasó la apoptosis de los neutrófilos cultivados en concentraciones consideradas representativas de las detectadas en la circulación sistémica normal de seres humanos<sup>106</sup>. En conjunto, estos datos indican que, en un estado de inflamación crónica como el de la AR, la IL-6 podría respaldar la ampliación sustancial y anómala del periodo de vida de los neutrófilos, por lo que permitiría una mayor contribución a la inflamación articular y a la degradación del tejido del hospedador<sup>63</sup>.



## El papel de la IL-6 y los neutrófilos en la transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica en la AR

La transición de la inflamación aguda a la crónica en la AR, que se caracteriza por un cambio en la composición celular de la membrana sinovial, puede estar en parte dirigida por la señalización de la IL-6 en *trans*<sup>1,85,88</sup>. En la inflamación aguda en condiciones normales, el infiltrado tisular inicial está compuesto principalmente de neutrófilos; no obstante, al cabo de entre 1 y 2 días, aproximadamente, predominan los monocitos<sup>88</sup>. Tal y como se ha expuesto en una sección anterior, este cambio en la composición celular está modulado por un cambio en la producción de quimiocinas de IL-8 a MCP-1 y, en condiciones normales, comienza la resolución de la inflamación<sup>85,88</sup>. En la AR, la acumulación de los neutrófilos con un periodo de vida más largo dentro de la membrana sinovial, junto con la elevada concentración de IL-6 y sIL-6R, permitirían el mantenimiento de la señalización de la IL-6 en *trans* y, en consecuencia, el aumento del reclutamiento de monocitos<sup>88</sup>. En modelos animales de AIC y artritis autoinmunitaria (AAI), se ha observado que la IL-6 es esencial para el reclutamiento de monocitos, ya que los ratones IL-6<sup>-/-</sup> no desarrollaron el infiltrado denso de monocitos que es característico de los modelos<sup>110,111</sup>.

La acumulación de monocitos dentro de la membrana sinovial provoca la formación del *pannus* sinovial, un revestimiento sinovial engrosado e hipertrófico. El *pannus* sinovial está constituido por monocitos activados, así como por macrófagos, neutrófilos, linfocitos y STF, todos ellos secretores de mediadores proinflamatorios<sup>60</sup>. Estos mediadores contribuyen a la activación de los osteoclastos, que están ubicados en el límite entre el *pannus* y el hueso y son responsables de la resorción ósea, y

de los STF, que liberan metaloproteasas de matriz solubles que degradan el colágeno del cartílago<sup>1,60,112</sup>. También se ha mostrado que los neutrófilos asociados al *pannus* producen grandes cantidades de enzimas proteolíticas que invaden y degradan la matriz del cartílago y contribuyen a la destrucción del hueso subcondral en la AR<sup>60,113</sup>. La IL-6 podría estar implicada en la activación mantenida y la invasividad de todas estas células, por medio de la organización de ciclos de retroalimentación entre ellas (**Figura 3**). Los estudios de la AAI y la AIC en modelos animales apuntan a que la IL-6 desempeña un papel fundamental en el desarrollo del *pannus* sinovial y la destrucción tisular por sucesión ordenada de sus diversas etapas. Dos estudios independientes han mostrado que, en ratones IL-6<sup>-/-</sup>, la hiperplasia sinovial fue limitada, se suprimió la formación del *pannus* sinovial y no se observaron erosiones del cartílago ni del hueso articular<sup>110,111</sup>. En conjunto, estos resultados proporcionan más indicios de la implicación de los neutrófilos en la promoción de la cronicidad de la AR y de la contribución de la señalización anómala de la IL-6 a los efectos patológicos de estas células.

# Conclusiones

Los neutrófilos son leucocitos multifuncionales que actúan como primera línea de defensa contra los microbios patógenos invasores y desempeñan un papel crucial en la aparición de lesiones provocadas por la inflamación. En la AR, estas mismas funciones pueden estar amplificadas o desreguladas, lo cual contribuye al mantenimiento y la perpetuación del mecanismo patogénico de producción de autoantígenos, autorreactividad e inflamación<sup>10</sup>. La IL-6, una citoquina proinflamatoria fundamental, influye en múltiples actividades de los neutrófilos, desde su salida inicial de la médula ósea y hasta su muerte. A su vez, los neutrófilos promueven la persistencia de la señalización de IL-6 en *cis* y en *trans* en los tejidos inflamados, provocando finalmente la transición de una inflamación aguda a una crónica<sup>85,88</sup>. El incremento de la señalización de IL-6 puede aumentar las concentraciones de neutrófilos circulantes, así como su reclutamiento hacia los focos de inflamación. La IL-6 también puede influir en la generación de autoantígenos, en la capacidad de producir citotoxicidad y netosis, y en el momento de la apoptosis<sup>1,52,56,57,85</sup>. En conjunto, las interacciones entre los neutrófilos y la vía de señalización de la IL-6 promueven de manera sustancial los mecanismos patógenos que causan la inflamación crónica y el daño tisular asociados a la AR<sup>55</sup>.

# Bibliografía

1. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365:2205-2219.
2. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:429-442.
3. Manicourt D-H, Triki R, Fukuda K, Devogelaer J-P, Nagant de Deuxchaisnes C, Thonar EJ-MA. Levels of circulating tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of hyaluronan and antigenic keratan sulfate. *Arthritis Rheum*. 1993;36:490-499.
4. Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. *Semin Immunol*. 2016;28:159-28173.
5. Chen D-Y, Chen Y-M, Chen H-H, Hsieh C-W, Lin C-C, Lan J-L. 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:R126. doi:10.1186/ar3431 [publicado en línea el 30 de julio de 2011].
6. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(suppl 5):v3-v11.
7. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16:448-457.
8. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:720-727.
9. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8:1227-1236.
10. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:593-601.
11. Schmidt EP, Lee WL, Zemans RL, Yamashita C, Downey GP. On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26:334-347.
12. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218.
13. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159-175.
14. Grayson PC, Schauer C, Herrmann M, Kaplan MJ. Review: Neutrophils as invigorated targets in rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68:2071-2082.
15. Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res*. 2000;2:101-114.
16. Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brécard S. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. *J Immunol Res*. 2015;2015:817038. doi:10.1155/2015/817038 [publicado en línea el 22 de octubre de 2015].
17. Perry E, Kelly C, Eggleton P, De Soyza A, Hutchinson D. The lung in ACPA-positive rheumatoid arthritis: an initiating site of injury? *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:1940-1950.
18. Ursum J, Bos WH, van de Stadt RJ, Dijkmans BAC, van Schaardenburg D. Different properties of ACPA and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct autoantibody systems. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R75. doi: 10.1186/ar2704 [publicado en línea el 21 de mayo de 2009].
19. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2741-2749.
20. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:2151-2156.
21. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176:231-241.
22. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30:513-521.
23. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönhermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15:623-625.
24. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5:178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580 [publicado en línea el 27 de marzo de 2013].
25. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011;3:73ra20. doi:10.1126/scitranslmed.3001201 [publicado en línea el 9 de marzo de 2011].
26. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012;189:2689-2695.
27. König MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front Immunol*. 2016;7:461. doi:10.3389/fimmu.2016.00461 [publicado en línea el 4 de noviembre de 2016].
28. Lightfoot YL, Kaplan MJ. Disentangling the role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29:65-70.
29. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12:402-413.
30. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123:2768-2776.
31. Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis—the journey of TF through NETs. *Front Immunol*. 2012;3:385. doi:10.3389/fimmu.2012.00385 [publicado en línea el 18 de diciembre de 2012].
32. Ammolto CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*. 2011;9:1795-1803.
33. Borissoff JJ, ten Cate H. From neutrophil extracellular traps release to thrombosis: an overshooting host-defense mechanism? *J Thromb Haemost*. 2011;9:1791-1794.
34. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2008;59:1690-1697.
35. Warrington KJ, Kent PD, Frye RL, et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R984-R991.
36. Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, et al. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1608-1612.
37. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*. 2014;5:508. doi:10.3389/fimmu.2014.00508 [publicado en línea el 21 de octubre de 2014].
38. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8:361ra76. doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921 [publicado en línea el 14 de diciembre de 2016].
39. Spengler J, Lugonja B, Ytterberg AJ, et al. Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:3135-3145.
40. Chang H-H, Dwivedi N, Nicholas AP, Ho I-C. The W620 polymorphism in PTPN22 disrupts its interaction with peptidylarginine deiminase type 4 and enhances citrullination and NETosis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2323-2334.
41. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PAD14, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003;34:395-402.
42. Darrah E, Giles JT, Ols ML, Bull HG, Andrade F, Rosen A. Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. *Sci Transl Med*. 2013;5:186ra165. doi:10.1126/scitranslmed.3005370 [publicado en línea el 22 de mayo de 2013].
43. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgrén A-K, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1488-1492.
44. Hosseinzadeh A, Thompson PR, Segal BH, Urban CF. Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol*. 2016;100:1105-1112.

45. Scally SW, Petersen J, Law SC, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2013;210:2569-2582.
46. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*. 2003;171:538-541.
47. Ling S, Cline EN, Haug TS, Fox DA, Holoshitz J. Citrullinated calreticulin potentiates rheumatoid arthritis shared epitope signaling. *Arthritis Rheum*. 2013;65:618-626.
48. Koning F, Thomas R, Rossjohn J, Toes RE. Coeliac disease and rheumatoid arthritis: similar mechanisms, different antigens. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11:450-461.
49. Jones JE, Causey CP, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Dev*. 2009;12:616-627.
50. Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, Balakrishnan A, Ramachandra L, Satyamorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett*. 2013;587:2241-2246.
51. Ruiz-Limón P, Ortega R, Arias de la Rosa I, et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res*. 2016. doi:10.1016/j.trsl.2016.12.003 [publicado en línea el 9 de diciembre de 2016].
52. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr, Silliman CC, Peterson VM. Interleukin-6 stimulates neutrophil production of platelet-activating factor. *J Leukoc Biol*. 1996;59:569-574.
53. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:235-243.
54. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31:318-324.
55. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1618-1631.
56. Suwa T, Hogg JC, English D, Van Eeden SF. Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2954-H2960.
57. Wright HL, Cross AL, Edwards SW, Moots RJ. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:1321-1331.
58. Moots RJ, Sebba A, Rigby W, et al. Effect of tocilizumab on neutrophils in adult patients with rheumatoid arthritis: pooled analysis of data from phase 3 and 4 clinical trials. *Rheumatology (Oxford)*. 2016. doi:10.1093/rheumatology/kew370 [publicado en línea el 24 de diciembre de 2016].
59. Daniel D, Crawford J. Myelotoxicity from chemotherapy. *Semin Oncol*. 2006;33:74-85.
60. Jung SM, Kim KW, Yang C-W, Park S-H, Ju JH. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*. 2014;2014:263625. doi:10.1155/2014/263625 [publicado en línea el 10 de septiembre de 2014].
61. Sung J-Y, Hong J-H, Kang H-S, et al. Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology*. 2000;47:35-44.
62. Brach MA, deVos S, Gruss H-J, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 1992;80:2920-2924.
63. Caiello I, Minnone G, Holzinger D, et al. IL-6 amplifies TLR mediated cytokine and chemokine production: implications for the pathogenesis of rheumatic inflammatory diseases. *PLoS One*. 2014;9:e107886. doi:10.1371/journal.pone.0107886 [publicado en línea el 1 de octubre de 2014].
64. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*. 2000;287:1037-1040.
65. Hashizume M, Higuchi Y, Uchiyama Y, Mihara M. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine*. 2011;54:92-99.
66. Lally F, Smith E, Filer A, et al. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3460-3469.
67. Uchiyama Y, Yorozu K, Hashizume M, Moriya Y, Mihara M. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, ameliorates joint swelling in established monkey collagen-induced arthritis. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1159-1163.
68. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:265-278.
69. Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. *Arthritis Rheum Dis*. 2002;6:13-19.
70. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2006;2:98-108.
71. Haselmayer P, Tenzer S, Kwon BS, Jung G, Schild H, Radsak MP. Herpes virus entry mediator synergizes with Toll-like receptor mediated neutrophil inflammatory responses. *Immunology*. 2006;119:404-411.
72. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:511-516.
73. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:1126-1167.
74. Laragione T, Yarlett NC, Brenner M, et al. The arthritis severity quantitative trait loci Cia4 and Cia6 regulate neutrophil migration into inflammatory sites and levels of TNF-alpha and nitric oxide. *J Immunol*. 2007;178:2344-2351.
75. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*. 1994;62:2195-2201.
76. Hirao M, Yamasaki N, Oze H, et al. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol Int*. 2012;32:4041-4045.
77. de Siqueira MBP, da Mota LMH, Couto SCP, Muniz-Junqueira MI. Enhanced neutrophil phagocytic capacity in rheumatoid arthritis related to the autoantibodies rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptides. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:159. doi:10.1186/s12891-015-0616-0 [publicado en línea el 30 de junio de 2015].
78. Talbot J, Bianchini FJ, Nascimento DC, et al. CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into the joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:1751-1759.
79. Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm (Lond)*. 2013;10:27. doi:10.1186/1476-9255-10-27 [publicado en línea el 31 de julio de 2013].
80. Monach PA, Hueber W, Kessler B, et al. A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:15867-15872.
81. Chen K, Nishi H, Travers R, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*. 2012;120:4421-4431.
82. Schumacher N, Meyer D, Mauermann A, et al. Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles. *J Biol Chem*. 2015;290:26059-26071.
83. Dayer J-M, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:15-24.

84. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*. 1994;300(pt 2):281-290.
85. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-888.
86. Newson J, Stables M, Karra E, et al. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*. 2014;124:1748-1764.
87. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:721608. doi:10.1155/2011/721608 [publicado en línea el 20 de septiembre de 2011].
88. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001;14:705-714.
89. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6735-6741.
90. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*. 2000;1:510-514.
91. McCubrey AL, Curtis JL. Efferocytosis and lung disease. *Chest*. 2013;143:1750-1757.
92. Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol*. 2003;171:2610-2615.
93. Bellingan GJ, Laurent GJ. Fate of macrophages once having ingested apoptotic cells: lymphatic clearance or in situ apoptosis? In: Rossi AG, Sawatzky DA, eds. *The Resolution of Inflammation*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Basel; 2008:75-91.
94. Huynh M-L, Malcolm KC, Kotaru C, et al. Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:972-979.
95. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*. 2010;189:1059-1070.
96. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest*. 2002;109:661-670.
97. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:216-221.
98. Kawane O, Khtani M, Miwa K, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*. 2006;443:998-1002.
99. Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2016;7:485. doi:10.3389/fimmu.2016.00485 [publicado en línea el 14 de noviembre de 2016].
100. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Principles of innate and adaptive immunity. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed. New York, NY: Garland Science; 2001.
101. Cross A, Barnes T, Bucknall RC, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J Leukoc Biol*. 2006;80:521-528.
102. Parsonage G, Filer A, Bik M, et al. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R47. doi:10.1186/ar2406 [publicado en línea el 23 de abril de 2008].
103. Ahmed S, Silverman MD, Marotte H, Kwan K, Matuszczak N, Koch AE. Down-regulation of myeloid cell leukemia 1 by epigallocatechin-3-gallate sensitizes rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1282-1293.
104. Asensi V, Valle E, Meana A, et al. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*. 2004;72:3823-3828.
105. Gaber T, Hahne M, Strehl C, et al. Disentangling the effects of tocilizumab on neutrophil survival and function. *Immunol Res*. 2016;64:665-676.
106. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol*. 1995;58:582-584.
107. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, et al. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest*. 2003;112:598-607.
108. Afford SC, Pongracs J, Stockley RA, Crocker J, Burnett D. The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J Biol Chem*. 1992;267:21612-21616.
109. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992;80:2012-2020.
110. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, et al. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8222-8226.
111. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, et al. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*. 1998;187:461-468.
112. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:665-664.
113. Moore AR, Iwamura H, Larbre JP, Scott DL, Willoughby DA. Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes: in vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis*. 1993;52:27-31.





