

Tesis Doctoral

**EFFECTO DEL TOCILIZUMAB SOBRE EL PERFIL ATERO-
TROMBÓTICO EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE: ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL
Y LA INFLAMACIÓN.**

Tesis doctoral presentada por María Rafaela Ortega Castro,

Licenciada en Medicina, por la que opta al grado de Doctor en Medicina

Directoras de la Tesis Doctoral:

Dra. Nuria Barbarroja Puerto

Dra. Rosario López Pedrera



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TITULO: *Efecto del Tocilizumab sobre el perfil atero-trombótico en pacientes con artritis reumatoide: análisis de la función endotelial y la inflamación*

AUTOR: *María Rafaela Ortega Castro*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



EFFECTO DEL TOCILIZUMAB SOBRE EL PERFIL ATEROTROMBÓTICO EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE: ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y LA INFLAMACIÓN

Memoria presentada por:

María Rafaela Ortega Castro

Licenciada en Medicina y Cirugía, para optar al grado de Doctor.

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de la Dra. Nuria Barbarroja Puerto y la Dra. Rosario López Pedrera en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)

Programa doctorado de Biomedicina.

La doctoranda

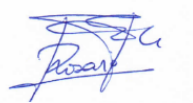


Rafaela Ortega Castro

Las directoras de la tesis



Dra. Nuria Barbarroja Puerto



Dra. Rosario López Pedrera

TÍTULO DE LA TESIS: Efecto del Tocilizumab sobre el perfil aterotrombótico en pacientes con artritis reumatoide: Análisis de la función endotelial y la inflamación

DOCTORANDA: María Rafaela Ortega Castro

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. María Rafaela Ortega Castro presenta un trabajo original en el que se ha analizado el efecto de un fármaco biológico, Tocilizumab (anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente al receptor de la IL-6) sobre la disfunción endotelial y la alteración del estatus oxidativo, así como sobre los cambios moleculares en la actividad inflamatoria de los monocitos y los neutrófilos, principales mecanismos responsables del desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular en los pacientes con artritis reumatoide.

Los resultados obtenidos de este trabajo han sido publicados en la revista científica de reconocido prestigio internacional en el campo de la investigación en biomedicina: *Translational Research* (Decil 1).

La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de diversos proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI12/01511 y PI15/01333) y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-7940) de la Junta de Andalucía.

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la capacitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

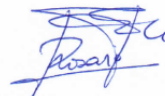
Córdoba, 22 de Mayo de 2017

Firma del/de los director/es

Nuria Barbarroja Puerto



Rosario LópezPedrera



Fdo.: _____

Fdo.: _____

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo.”

(Benjamín Franklin)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar estas líneas para agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo:

A mi jefe y tutor, Prof. Collantes: Gracias por despertar ese “gusanillo investigador” en cada uno de nosotros; por ser el alma del equipo, por tu capacidad de liderazgo y ese entusiasmo contagioso que nos hace querer superarnos y ser mejores día a día. Consigues que nos involucremos y aprendamos. Eres un gran ejemplo, GRACIAS.

A mis directoras, Dra. Barbarroja y Dra. Pedrera, agradecer su ayuda y disposición en todo momento. Habéis permitido que sea posible algo que veía inalcanzable. Gracias por vuestra confianza y capacidad de trabajo. Porque ponéis el corazón y vuestra esencia en todo lo que hacéis y eso se traduce en esa brillantez que os caracteriza, GRACIAS.

A la otra parte del grupo de investigación G-05, del cual me siento parte, Yolanda, Carlos, M^a Carmen, Iván y especialmente Patricia, por permitir que este trabajo haya sido posible. GRACIAS por enseñarme lo que significa trabajar en equipo, sois una pña y lo demostráis en todo lo que hacéis.

A mis compañeros y amigos de la Reumatología, gracias a todos y cada uno de vosotros, a esa gran familia reumatológica, porque sin vuestra ayuda cada día, consejos y enseñanzas nada tendría sentido, simplemente GRACIAS.

A mi familia y amigos, GRACIAS por estar siempre a mi lado y confiar en mí en todo momento, sois los mejores.

A mi marido, por ser casa, refugio y hogar, sin tu apoyo diario nada sería posible, GRACIAS.

Un especial agradecimiento a mis padres, por enseñarme lo que significa el trabajo duro, la humildad y el cariño infinito, GRACIAS.

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune, caracterizada por sinovitis persistente principalmente de pequeñas articulaciones. Aunque la membrana sinovial es el foco principal de la lesión, esta patología puede manifestarse de forma extraarticular, dando lugar a complicaciones severas y comorbilidades tales como aterosclerosis acelerada y enfermedad cardiovascular, suponiendo una de las principales causas de mortalidad en estos pacientes.

El tratamiento de la AR ha sufrido un gran avance en las últimas décadas gracias al desarrollo de terapias biológicas dirigidas frente a moléculas específicas implicadas en la cascada inflamatoria y/o respuesta inmune. En este sentido, Tocilizumab (TCZ), anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente al receptor de IL-6, ha demostrado ser un tratamiento eficaz para el control de la actividad inflamatoria de la AR. Sin embargo, sus efectos sobre el perfil aterotrombótico que presentan los pacientes AR aún no han sido analizados.

Por tanto, el objetivo de la presente tesis fue investigar el efecto de TCZ sobre la disfunción endotelial y la alteración del estatus oxidativo, así como analizar los cambios moleculares en la actividad inflamatoria de los monocitos y los neutrófilos, principales mecanismos responsables del desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular en los pacientes con AR.

Materiales y métodos: En este trabajo se llevaron a cabo estudios *in vivo* en una cohorte de 20 pacientes con AR (criterios ACR 1987/2010) con respuesta inadecuada a fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs), a los que se les administró TCZ (162 mg) una inyección subcutánea semanal durante 6 meses. Se realizó una evaluación clínica y analítica y se recogieron muestras de sangre periférica antes y después del tratamiento. Para evaluar la especificidad del TCZ se llevaron a cabo estudios *in vitro* con la línea celular endotelial HUVEC y monocitos y neutrófilos purificados de pacientes AR con alta actividad de la enfermedad y que no tomaban ninguna terapia biológica.

Se analizó la función microvascular endotelial mediante la prueba de hiperemia reactiva post-oclusiva (PORH) realizada con un Laser-Doppler linear Periflux 5010. Se midieron los niveles de moléculas de adhesión VCAM-1 y E-selectina en el plasma de los pacientes AR. Se analizaron marcadores de estrés oxidativo en monocitos y

neutrófilos por citometría de flujo. Se analizó los niveles de expresión génica de un panel de moléculas implicadas en inflamación, adhesión celular y migración en monocitos y células endoteliales. Se realizó un array de proteínas para medir la fosforilación de 18 kinasas en los monocitos de los pacientes AR. Se midió la generación de NETosis inducida *in vitro* con PMA o IL-6 mediante la tinción con SYTOX de las fibras de ADN y la expresión de mieloperoxidasa y elastasa en neutrófilos. El porcentaje de granulocitos de baja densidad se determinó por citometría de flujo.

Resultados: TCZ mejoró la actividad de la enfermedad, los parámetros clínicos y los perfiles lipídico y autoinmune tras 6 meses de tratamiento. TCZ mejoró la disfunción endotelial y redujo el estrés oxidativo de monocitos y neutrófilos de pacientes AR. En cuanto al monocito, el tratamiento con TCZ moduló su actividad proinflamatoria y protrombotica mediante la reducción de genes implicados en la inflamación, migración y la fosforilación de vías intracelulares específicas. En la alteración de la función del neutrófilo, TCZ disminuyó el porcentaje de granulocitos de baja densidad y previno la generación de NETosis. Todos estos resultados *in vivo* se confirmaron después del tratamiento *in vitro* con TCZ de monocitos y neutrófilos purificados de pacientes con AR y con cocultivos con células endoteliales.

Conclusiones: TCZ es un fármaco que mejora el perfil proaterotrombótico en pacientes con AR mediante la regulación simultánea de la dislipidemia, la disfunción endotelial y la actividad inflamatoria de monocitos y neutrófilos, a través de mecanismos implicados en la modulación del estrés oxidativo, NETosis y vías de señalización intracelular.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	8
ARTRITIS REUMATOIDE	8
1. Concepto y epidemiología	8
2. Etiopatogenia.....	9
3. Genética y factores ambientales:.....	11
4. Fisiopatología:.....	13
4.1 Monocitos-macrófagos	16
4.2 Linfocitos.....	16
4.3 Neutrófilos	18
5. Papel de las citoquinas en la AR.....	21
La IL-6 en la fisiopatología de la AR:	22
COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA AR: ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	25
FACTORES INVOLUCRADOS	26
1. INFLAMACION	26
2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y ATROSCLEROSIS.....	28
3. ESTRÉS OXIDATIVO	31
4. NETOSIS	32
TRATAMIENTO DE LA AR	34
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
-Pacientes	43
-Determinación de la función endotelial	45
-Aislamiento de células blancas.....	45
-Tratamientos in vitro de monocitos, neutrófilos y células endoteliales.....	46
-Co-cultivos de monocitos AR-HUVEC	47

-Aislamiento de ARN	48
-Retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real.....	48
-Determinación de marcadores de estrés oxidativo en monocitos y neutrófilos	49
-Análisis de la generación de NETosis en neutrófilos de pacientes con AR	49
-Detección de nucleosomas libre de células	50
-Identificación de Granulocitos de baja Densidad (LDGs).....	51
-Análisis de la expresión proteica de Elastasa (NE) y Mieloperoxidasa (MPO) en neutrófilos de pacientes con AR.	51
-Aislamiento de proteínas y array de proteínas intracelulares PathScan	51
-Determinación de moléculas de adhesión en plasma de pacientes con AR	52
-Análisis Estadístico	52
RESULTADOS	54
-TCZ mejoró la actividad de la enfermedad, los parámetros clínicos y la DE en pacientes con AR.	54
-TCZ redujo el estrés oxidativo en los leucocitos de los pacientes con AR.	57
-El tratamiento con TCZ en pacientes con AR redujo el porcentaje de granulocitos de baja densidad y la generación de NETosis.....	58
-El tratamiento in vivo con TCZ redujo el perfil procoagulante e inflamatorio y moduló la señal de la insulina en los monocitos de pacientes AR.....	60
-TCZ modificó la activación de diversas rutas intracelulares en monocitos de pacientes con AR.	61
-El tratamiento in vitro con TCZ de los neutrófilos y monocitos purificados de pacientes con AR reduce la generación de NETosis y mejora el perfil inflamatorio y trombótico de los monocitos.....	62
-TCZ redujo significativamente la elevada expresión de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios inducida por IL-6 en células endoteliales solas o cocultivadas con monocitos purificados de pacientes con AR	64

DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	99

LISTADO DE ABREVIATURAS

A continuación se presentan las abreviaturas usadas a lo largo de la tesis doctoral:

ACR	Colegio Americano de Reumatología, del inglés American College of Rheumatology.
ACPA	Anticuerpos antipéptido citrulinados cíclicos
AD	Articulaciones dolorosas
AI	Articulaciones inflamadas
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ADRP	Adipofilina
AH	Área hiperémica
AKT1S1	Substrato AKT1
Anti-TNFα	Anti-factor de necrosis tumoral alpha
AO	Área de oclusión
APRIL	Ligando inductor de la proliferación del linfocito B
AR	Artritis Reumatoide
AT	Ateroesclerosis
BBE	Extracto de cerebro de bovino, del inglés Bovine brain extract
BZ	Valor máximo de perfusión cuando se ocluye, del inglés Biological zero
CCR2	Receptor de quimioquinas C-C tipo 2, del inglés C-chemokine receptor type 2)
CD	Célula dendrítica
CO₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
Ct	Valor del umbral de ciclo, del inglés Threshold cycle value

CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
DAS28	Tasa de actividad de la enfermedad, del inglés Disease activity score, sobre 28 articulaciones
DE	Disfunción endotelial
DESVEST	Desviación estándar
DGAT	Diglicerido aciltransferasa
DM	Diabetes mellitus
DMARD	Fármacos modificadores de la enfermedad, del inglés disease modifying antirheumatic drugs
DMARDs-b	DMARDs biológicos
DMARDs-c	DMARDS convencionales o sintéticos
EBM	Medio de célula endotelial basal
ERK	De sus siglas en inglés, Extracellular signal-regulated kinase
EVA	Escala visual analógica
EULAR	La liga europea contra las enfermedades reumáticas, del inglés The European League Against Rheumatism
FAME	Fármaco modificador de la enfermedad
Fc	Fracción constante
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FR	Factor reumatoide
FT	Factor tisular
GSH	Glutación intracelular
Gp130	Glicoproteína 130
GWASs	Estudios de asociación genética, del inglés genomic wide association studies

HAQ	Cuestionario de evaluación de salud, del inglés Health assessment questionnaire
HDL	Colesterol de alta densidad, del inglés High-density lipoprotein
HLA	Antígenos leucocitarios humanos, del inglés human Leukocyte antigen
HTA	Hipertensión arterial
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico humano
HO₂•	Radical hidroperóxido
H₂O₂•	Peróxido de hidrógeno
HO•	Radical hidroxilo
HUVEC	Línea celular endotelial de la vena del cordón umbilical humano
IAM	Infarto agudo de miocardio
IC	Inmunocomplejos
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleuquina
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
JNK	De sus siglas en inglés, c-Jun N-terminal kinasa
LDGs	Granulocitos de baja densidad, del inglés Low-density granulocytes
LDL	Colesterol de baja densidad, del inglés Low-density lipoprotein
LpA	Lipoproteína A
MAb	Anticuerpo monoclonal
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mIL-6R	Receptor de membrana de IL6
MMP	Metaloproteinasas
MPO	Mieloperoxidasa
MTX	Metotrexato
NADPH	De sus siglas en inglés, nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase
NE	Elastasa de neutrófilos
NETs	Redes extracelulares de cromatina y contenido granular de neutrófilo, del inglés Neutrophil extracellular traps
NF	Flujo normal
NO	Óxido nítrico
NO2	Dióxido de nitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOX	NADPH oxidasa
NK	Natural Killers
OD	Densidad óptica
-OX	Oxidados
O2-•	Radical superóxido
p-p38	Proteína quinasa 14 fosfo-mitógeno activada
PAD4	Péptido arginina deaminasa, tipo IV
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés buffer phosphate saline
PI3K	De sus siglas en inglés Phosphatidylinositide-3-Kinase
PMBCs	Células mononucleares aisladas de sangre periférica
PCR	Proteína C Reactiva
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario

PE	Ficoeritrina
PF	Pico de flujo
pGSK-3b	Fosfo glicógeno sintetasa quinasa 3 beta
pHSP27	Proteína de choque térmico fosfato 27
PLIN2	Proteína asociada a las gotas de lípidos
PKB/AKT	Fosfo proteína quinasa B
PMA	Forbol-12-miristato Acetato
PMN	Polimorfonucleares
PmTOR	De sus siglas en inglés, Phospho mechanistic target of rapamycin
PORH	Hiperemia reactiva post-oclusiva
pPRAS40	Substrato Akt rico en prolina
PRKAA1/pAMPKa	Subunidad catalítica de fosfo proteína-quinasa activada por AMP alfa 1
RANK	Receptor activador del factor nuclear Kappa β
RF	Valor de perfusión normal
RFA	Reactantes de fase aguda
RO•	Radical alcoxi
ROO•	Radical peroxi
SAPK/MAPK	De sus siglas en inglés stress-activated protein kinase/mitogen-activated protein kinase
SE	Epítipo compartido, del inglés shared epitope
SER	Sociedad Española de Reumatología
STAT/JAK:	Activador de la transcripción y transductor de la señal/ Kinasa Janus (del inglés signal transducer and activator of transcription/ Janus Kinase)
sIL-6R	Receptor soluble de IL-6
TCZ	Tocilizumab

TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta
TH1	Tiempo hasta la mitad antes de la hiperemia
TH2	Tiempo hasta la mitad después de la hiperemia
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Tiempo máximo
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VDMF	Vasodilatación postoclusiva de la arteria braquial
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VGP	Valoración global del paciente
VSG	Velocidad de sedimentación globular

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

ARTRITIS REUMATOIDE

1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune caracterizada por sinovitis persistente, principalmente de las articulaciones pequeñas de manos y pies, junto con la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos antipéptido citrulinados cíclicos (ACPA) y por inflamación sistémica. A nivel local, las células inmunes invaden la membrana sinovial, dando lugar a la neovascularización, hiperplasia sinovial y formación de pannus, provocando la destrucción del cartílago y la erosión del hueso adyacente, lo cual produce deformidades y, en última instancia, la pérdida de la función de la articulación afectada.

Aunque la membrana sinovial es el foco principal de la lesión, esta patología puede manifestarse de forma extraarticular, dando lugar a complicaciones severas y comorbilidades tales como afectación pulmonar, anemia, síndrome febril, aterosclerosis acelerada, enfermedad cardiovascular y cerebrovascular, osteoporosis y depresión, entre otras ¹. La AR es una enfermedad compleja cuyas complicaciones y comorbilidades se asocian al deterioro de la capacidad funcional, así como disminución de la calidad de vida y pérdida de independencia que resultan en incapacidad laboral, mortalidad prematura y aumento del coste socio sanitario ^{2,3}.

Es una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes, alrededor del 1% de la población mundial. Su prevalencia varía entre países, siendo un 0,5% en nuestro país, según datos del estudio sobre prevalencia de las enfermedades reumáticas en la población española, EPISER ⁴. Las mujeres son tres veces más propensas a padecer esta enfermedad que los hombres y, aunque puede ocurrir a cualquier edad, tiene un pico de incidencia entre los 40 y los 60 años.

2. ETIOPATOGENIA

La AR es una enfermedad sistémica compleja cuya etiopatogenia no es totalmente conocida. El desarrollo de la enfermedad es el resultado de una interacción compleja entre genotipo, factores ambientales y azar, que desencadenan una activación repetida del sistema inmune innato y adquirido involucrada en la pérdida de la tolerancia inmunológica, la presentación aberrante de autoantígenos y la activación de linfocitos T y B. Todos estos eventos culminan en una hiperplasia sinovial y la destrucción ósea características de la enfermedad, ambas responsables de la inflamación articular y la inflamación sistémica⁵. Así pues, aunque la etiología de la AR es desconocida, se considera una enfermedad genética compleja, en la que diversos genes y factores ambientales, étnicos, geográficos y nutricionales interaccionan para causar los eventos patológicos (Figura 1). El inicio de la enfermedad parece ser desencadenado por factores ambientales, en función de una predisposición genética combinada con la alteración de las respuestas inflamatorias (linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas), células sinoviales residentes (fibroblastos sinoviales, células endoteliales y pericitos) y osteoclastos⁶. La interacción conjunta de estas células induce la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y enzimas que degradan la matriz en el sinovio o membrana sinovial. La mayoría de los pacientes presentan en suero autoanticuerpos como el FR y los ACPA, lo que ha conducido a la clasificación de la AR como una enfermedad autoinmune. Aunque el FR también puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes y condiciones inmunológicas como la infección crónica y en estados inflamatorios, la presencia de ACPA es altamente específica, evidencia de que la autoinmunidad frente a proteínas citrulinadas es un factor clave en la patogénesis de la AR. Sin embargo, aproximadamente un 20% de los pacientes no presentan autoanticuerpos, lo que sugiere una heterogeneidad etiológica de la enfermedad⁷. En los últimos años se están produciendo cambios en la comprensión de la patogenia de esta enfermedad, clásicamente considerada ante todo inflamatoria, dado que se consideraba que los linfocitos T eran las células clave de la AR. Sin embargo, los progresos desarrollados en las técnicas de biología molecular han identificado nuevas rutas, independientes de la expresión alterada de citoquinas, que también

contribuyen a su patogenia y para las que las estrategias terapéuticas antiinflamatorias o inmunosupresoras disponibles no son efectivas ⁸.

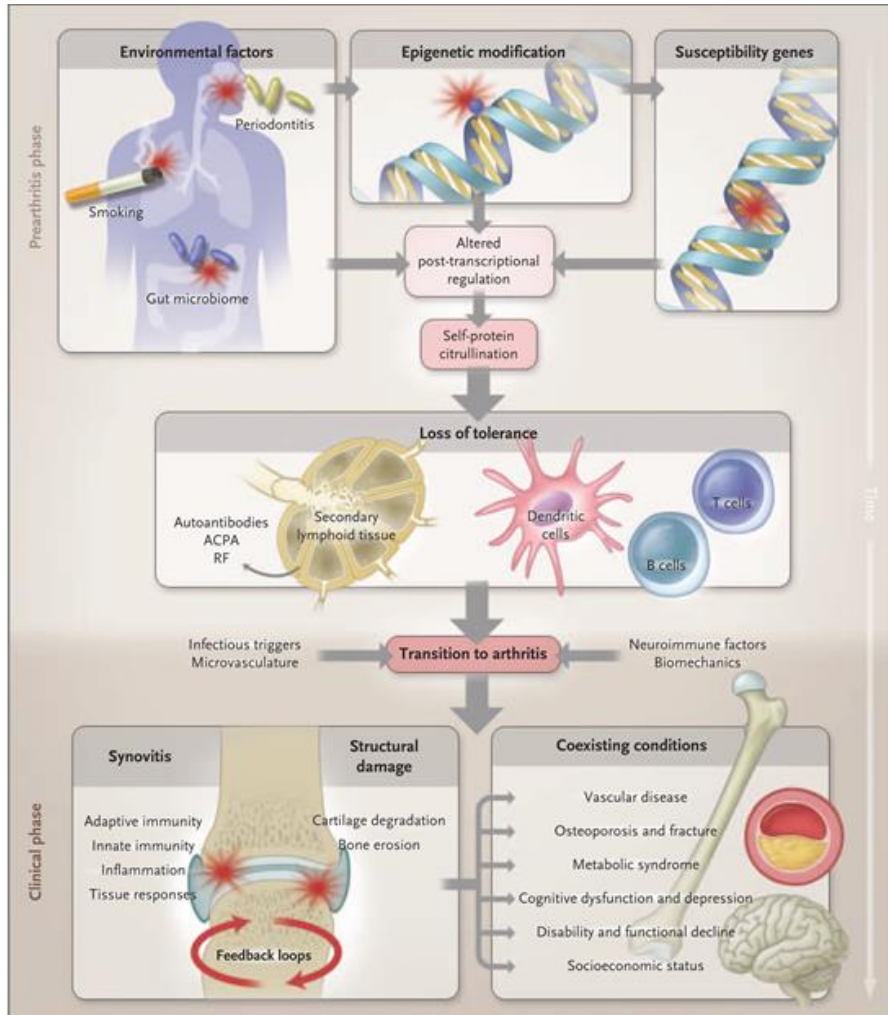


Figura 1. Etiopatogenia de la AR. Interacciones de los genes con los factores ambientales promueven una pérdida de tolerancia a proteínas propias que contienen residuos de citrulina, generados por modificaciones postranscripcionales. La respuesta anticitrulina puede ser detectada en los compartimentos de linfocitos T y B y probablemente sea iniciado en tejidos linfoides secundarios o en la médula ósea. Posteriormente, la respuesta inflamatoria ocurre en la articulación por mecanismos no bien conocidos que posiblemente involucran vías específicas microvasculares, neurológicas, biomecánicas o de otros tejidos. La sinovitis es iniciada y perpetuada por posibles mecanismos de feed-back que conducen al desorden sistémico que compone el síndrome de la AR. (Tomado de Iain B. McInnes. New England Journal Med 2011; 365:2205-19) [1].

3. GENÉTICA Y FACTORES AMBIENTALES

Los factores genéticos juegan claramente un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. Así, se considera que la AR es una enfermedad altamente heredable. Desde hace más de 3 décadas se conoce que existe un factor de susceptibilidad genética en esta patología⁹. La importancia que los genes tienen en el desarrollo de la enfermedad ha quedado demostrada mediante estudios realizados en gemelos monocigóticos, cuya tasa de concordancia es del 12-15%, y dicigóticos, con una tasa de concordancia del 4%^{10,11}. La heredabilidad en la AR es de un 65% aproximadamente, siendo algo superior para los pacientes ACPA positivos (68%). El factor de riesgo genético más importante para el origen y gravedad de la AR, corresponde al locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en concreto al sistema de HLA clase II (antígenos leucocitarios humanos, del inglés "*Human Leukocyte Antigen*"), un conjunto de genes implicados en el reconocimiento antigénico y la respuesta inmune, al cual se le atribuye entre un 30 y 50 % del riesgo genético total. En 1987, Peter Gregersen localizó entre los pacientes con AR una secuencia de aminoácidos muy conservada en la proteína HLA-DRB1, que recibió el nombre de epítipo compartido (SE, del inglés *Shared Epitope*). La secuencia se localiza en las posiciones 70-74 de la tercera región hipervariable de la cadena DRβ1. Contiene los aminoácidos conservados QKRAA, QRRAA o RRRAA. Los alelos que codifican para esta secuencia son los alelos HLA-DRB1*04 y HLA-DRB1*01. La principal función del HLA-DRB1 es la presentación de antígenos a las células T. Actualmente, se ha observado que el SE está fuertemente asociado a los pacientes con AR ACPA positivos (en estos pacientes, el SE explica el 18% de la heredabilidad, mientras que para los pacientes ACPA negativos solo explica el 2.4%). Parece ser que producirían alteraciones a nivel de la regulación postranscripcional, dando lugar a proteínas citrulinadas, que son reconocidas como extrañas, desencadenando la producción de anticuerpos ACPA en el inicio de la enfermedad. La presencia de estos alelos no solo incrementa el riesgo de padecer AR, especialmente seropositiva, sino que en numerosos estudios su presencia se ha asociado con interacciones con factores medioambientales como el tabaco¹²⁻¹⁶, así como también a un peor pronóstico, con un mayor grado de destrucción articular y presencia de manifestaciones extra-articulares¹⁷⁻¹⁹. Además, los numerosos

estudios de asociación genética GWASs (del inglés, *genomic-wide association studies*) realizados recientemente en AR han identificado más de 100 factores genéticos de riesgo, como por ejemplo STAT4, CTLA4, TRAF1/C5, TNFAIP3, CD40, IL2RA, IL2RB, REL, BLK, IRF5 entre otros (figura 2). La mayoría de los loci asociados con la AR se encuentran próximos a genes implicados en el sistema inmune, principalmente genes que intervienen en la activación de las células T y B o en las rutas de señalización de citoquinas, mostrando la importancia del sistema inmune en la patología de esta enfermedad²⁰.

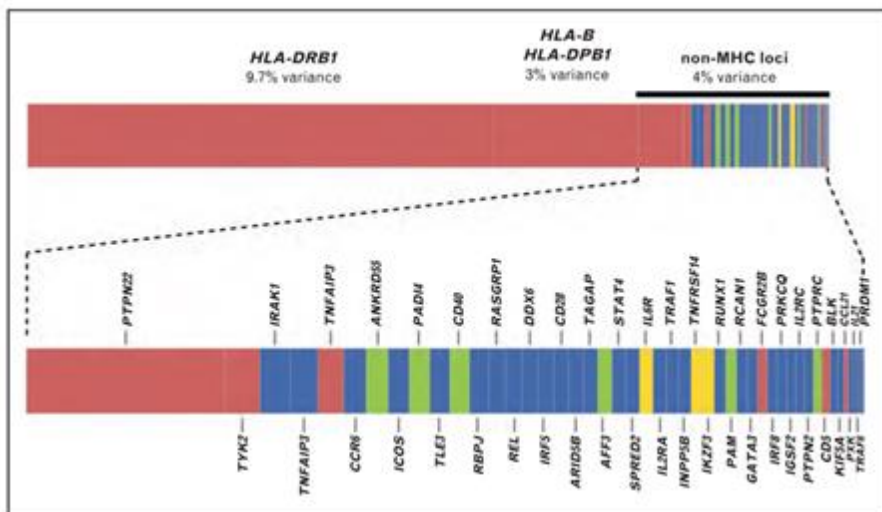


Figura 2: Genes de susceptibilidad para la AR. Estudios recientes de asociación genética GWASs (del inglés, *genomic-wide association studies*) han identificado más de 100 factores genéticos de riesgo en pacientes con AR, como por ejemplo STAT4, CTLA4, TRAF1/C5, TNFAIP3, CD40, IL2RA, IL2RB, REL, BLK, IRF5 entre otros. Imagen tomada de Diogo et al. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26:85-92) [²⁰]

Por otro lado, existen diferentes factores o agentes ambientales implicados en la patogenia de la AR, entre ellos se encuentran: a) factores hormonales, cuyo papel viene evidenciado por la mayor prevalencia de AR en mujeres, especialmente durante los años fértiles y la frecuente mejoría de la enfermedad durante el embarazo²¹, b) factores socioeconómicos, se ha observado una asociación inversa entre estos factores y el riesgo de desarrollar AR^{22,23}, c) factores dietéticos, se ha sugerido un papel protector de la dieta mediterránea por su alto contenido de omega 3^{24,25} y d) agentes

infecciosos, la periodontitis (producida por porphyromonas gingivalis) es 2 veces más frecuente en sujetos con AR que en la población sana²⁶, otros agentes infecciosos como el virus de Epstein-Baar, Citomegalovirus y Escherichia Coli han sido históricamente relacionados con el desarrollo de AR.

Estudios recientes han relacionado las alteraciones del microbioma intestinal con la presencia de autoanticuerpos positivos en esta enfermedad¹; Fumar y otras formas de estrés bronquial (por ejemplo, exposición a cristales de sílice) aumentan el riesgo a padecer esta enfermedad en personas predispuestas (la exposición a cristales de sílice, es un factor de riesgo bien definido que duplica el riesgo de padecer AR)²⁷. De entre todos los factores ambientales, el tabaquismo es el más ampliamente estudiado y del que existen mayores evidencias científicas sobre su implicación en esta enfermedad. Es conocido que el riesgo de padecer AR es 1.5-2 veces mayor en fumadores. Además se ha relacionado con la presencia de autoanticuerpos positivos (FR y/o ACPAs) en pacientes con esta enfermedad, así como con una mayor severidad de la sintomatología. Su efecto sobre la actividad de la enfermedad y su curso clínico es controvertido, así como sobre la progresión de la destrucción articular; no obstante algunos estudios apuntan sobre un fenotipo más grave de AR y una mayor progresión radiológica en los pacientes fumadores. Asimismo, estudios publicados recientemente confirman una peor respuesta al tratamiento en los pacientes fumadores²⁸.

4. FISIOPATOLOGÍA

La patogenia de la AR es compleja y en ella intervienen diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune innata y adquirida. La sinovitis ocurre cuando los leucocitos infiltran el compartimento sinovial a través de la activación endotelial en los vasos sinoviales, debido a un cambio microvascular que incrementa la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas. La interacción entre una célula presentadora de antígeno (CPA) y un linfocito T parece ser el paso clave en el inicio de la sinovitis^{29,30}, siendo la activación de las células T CD4+ el punto de partida de una cascada de fenómenos proinflamatorios con producción de una gran cantidad de citoquinas y proliferación celular, cuya perpetuación da lugar a una

inflamación crónica muy activa (propia de la AR) que es capaz de destruir los tejidos en los que se desencadena. En la membrana sinovial comienzan a proliferar las células infiltrantes de la sangre (linfocitos T y sus subtipos, y los linfocitos B) ³¹ y se produce una alteración de los elementos celulares residentes en el tejido conectivo de la membrana sinovial, que se comportan de forma pseudotumoral, invadiendo y destruyendo los tejidos contiguos dando lugar a una hiperplasia sinovial e inhibiendo la apoptosis (Figura 3).

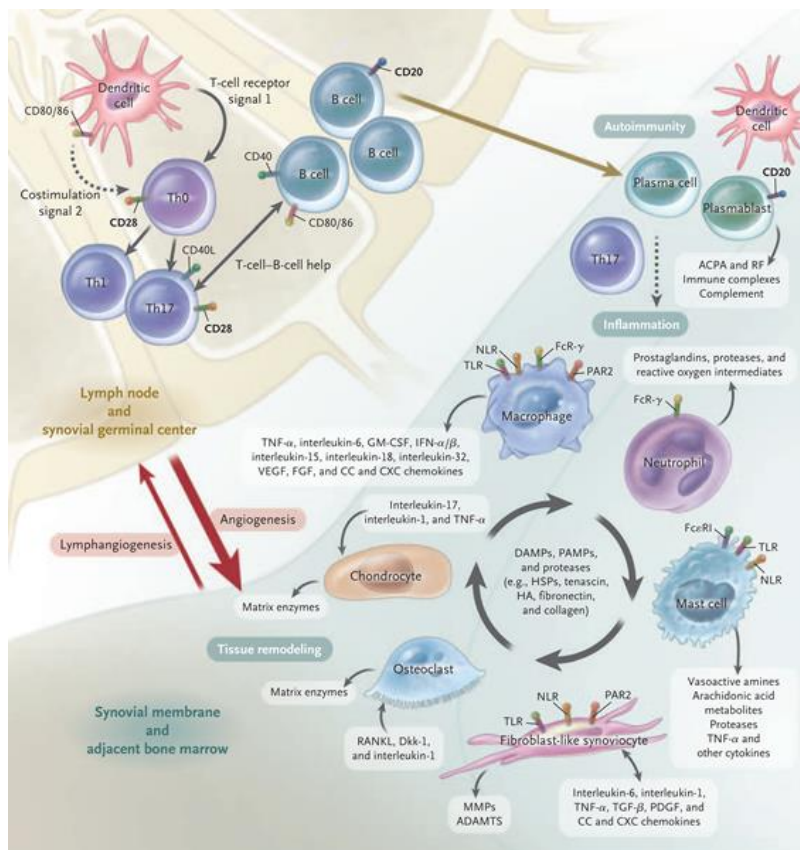


Figura 3. Proceso inmune innato y adquirido intraarticular en la AR. Las interacciones dependientes de la coestimulación entre las células dendríticas, T y B acontecen fundamentalmente en el ganglio linfático, dando lugar a una respuesta autoinmune en las proteínas que contienen citrulina. En la membrana sinovial y en la médula ósea adyacente, la inmunidad innata y adquirida se integran para promover la remodelación y el daño tisular. Los bucles de retroalimentación positivos mediados por las interacciones celulares entre los leucocitos, fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoclastos, junto con el desarrollo de un intenso infiltrado inflamatorio, impulsan la fase crónica en la patogénesis de la AR. (Tomado de Iain B. McInnes. New England Journal Med 2011;365:2205-19) [1].

Estas alteraciones van acompañadas de un incremento en los niveles de citoquinas y de un aumento en el número de fibroblastos junto con el exceso en la proliferación de células inflamatorias ³², principalmente macrófagos y linfocitos, destrucción tisular y angiogénesis ³³. Por tanto en su patogenia son necesarias células fagocíticas del sistema inmune innato, (incluyendo macrófagos y células dendríticas (CD)), células residentes en la membrana sinovial, (como los fibroblastos y las células endoteliales), y células inflamatorias procedentes de la sangre periférica (como los linfocitos T, B y los monocitos) ^{6,34}. Todas ellas contribuyen a la transformación del fenotipo de los fibroblastos y al desarrollo de un intenso infiltrado inflamatorio compuesto por citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz y catepsinas cuyo resultado final es la destrucción del cartílago y del hueso subcondral (Figura 4).

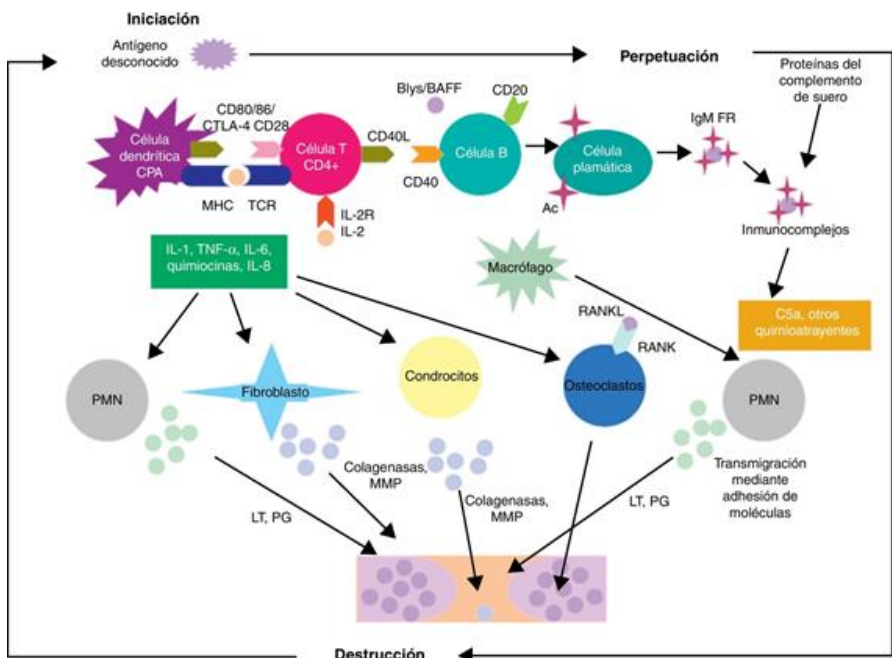


Figura 4: Esquema fisiopatológico general de la AR. La patogenia de la AR es compleja y en ella están implicadas diferentes poblaciones celulares: residentes en la membrana sinovial, (como los sinoviocitos B de estirpe fibroblástica o los macrófagos de la íntima) y las células inflamatorias provenientes de la sangre periférica, (como los linfocitos T y B y los monocitos), las cuales contribuyen a la transformación agresiva del fenotipo de los sinoviocitos B y al desarrollo de citoquinas proinflamatorias cuyo resultado final es la destrucción del cartílago y del hueso subcondral. (Imagen tomada de Herrero-Beaumont et al. *Reumatol Clin.* 2012;08:78-83.)^[35]

4.1 MONOCITOS-MACRÓFAGOS

En los últimos años, los macrófagos sinoviales activados han sido reconocidos como células cruciales en la persistencia de la AR. Existe un incremento de los monocitos activados circulantes en sangre periférica en los pacientes con AR ³⁶. Estos monocitos activados migran a la articulación y se diferencian en macrófagos y osteoclastos, dando lugar a un aumento de estas células que se correlaciona con la destrucción articular ^{37,38}. Son efectores centrales de la sinovitis en la AR, ya que favorecen la inflamación a través de la producción y liberación de citoquinas, oxígeno reactivo y productos intermedios de nitrógeno, prostanoïdes, y enzimas de degradación de la matriz. Son los principales productores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que a su vez, induce la liberación de otras citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina (IL)-1, IL-6 o IL-8, implicadas en la angiogénesis y la proliferación de los fibroblastos sinoviales, así como la producción de factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β). Los macrófagos sinoviales, junto con los fibroblastos, constituyen la principal fuente de producción de metaloproteinasas (MMP). Este fenómeno está directamente regulado por citoquinas como IL-1, TNF- α y TGF- β , secretadas a su vez por los macrófagos residentes de la membrana sinovial. Mediante la señalización de citoquinas, los macrófagos pueden reclutar y activar neutrófilos y mastocitos, que contribuyen directamente a la inflamación articular.

4.2 LINFOCITOS

Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos (como el FR y los ACPAs), como células activadoras de los linfocitos T en su función de CPA y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF- α y linfotóxina β . Los linfocitos T y B pueden formar agregados linfoides en el tejido sinovial, lo que sugiere que la presentación de antígenos tiene lugar localmente, mientras que en otros pacientes los linfocitos B se distribuyen en agregados o difusamente ³⁹. La generación inapropiada de células B autorreactivas es la alteración del sistema inmune más evidente en estos pacientes, ya que pueden ser detectadas junto con los autoanticuerpos, antes

de que aparezca la enfermedad. Los más importantes son el FR, el cual reconoce como autoantígeno la región constante (Fc) de la inmunoglobulina (Ig) G, y los ACPAs. Estas 2 respuestas son bastante específicas y se postula que la formación local o sistémica de inmunocomplejos, su acumulación articular, y la activación local de factores del complemento y de células efectoras, a través de receptores celulares de inmunoglobulinas (FcγR) o de receptores de factores del complemento (C3/C5aR), son un mecanismo central en la patogenia de la inflamación articular crónica. La activación de estos receptores en macrófagos induciría la producción de citoquinas y otros mediadores.

Asimismo, se conoce muy bien la implicación de la respuesta alterada de las células T en la patogenia de la enfermedad. En primer lugar, la importante asociación genética de la AR con alelos del HLA-DRB1 con el epitopo compartido, relacionado con la presentación antigénica a células T, y con otros genes como PTPN22, STAT4 y CTLA4, implicados en la activación de células T. En segundo lugar, la abundancia de células T CD4 de memoria en los infiltrados sinoviales. Por otro lado, la función de las células T CD4+ reguladoras está disminuida, lo que contribuye al desequilibrio entre los elementos efectoras y reguladores de la inmunidad. Además, recientemente en la AR se ha descrito un aumento de un nuevo subtipo de células T productoras de IL-17, Th17, aunque todavía quedan por realizar estudios adicionales para explicar la relevancia de esta citoquina o de las respuestas Th17 en la AR ⁴⁰. En última instancia, las citoquinas T locales activarían la producción de citoquinas proinflamatorias efectoras por macrófagos y fibroblastos. La activación mantenida de estos tipos celulares provoca la destrucción no sólo de la membrana sinovial, sino también del hueso subyacente y del cartílago articular dando lugar a las alteraciones estructurales propias de la AR.

4.3 NEUTRÓFILOS

En la AR, los neutrófilos son el tipo celular más abundante del líquido sinovial. Tanto los neutrófilos circulantes como los infiltrados en los tejidos tienen características de células activadas caracterizadas por una mayor capacidad de supervivencia y por la producción y secreción de una elevada cantidad de mediadores inflamatorios como quimioquinas y citoquinas. Participan en la osteoclastogénesis activando directamente a los precursores de los osteoclastos ^{41,42}, los cuales secretan IL-10, TGF- β e IL-6 y pueden actuar como células presentadoras de antígeno y activar células T CD4+ y CD8+ ⁴³.

Recientemente, se ha descrito el papel patogénico de la NETosis en la AR. La NETosis es un mecanismo de muerte celular del neutrófilo, diferente de la necrosis y de la apoptosis, en la cual ocurre la disolución de las membranas internas, seguidas de la decondensación de la cromatina y la liberación de redes extracelulares de cromatina y contenido granular de neutrófilos (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*). Estas redes incluyen histonas, péptidos antimicrobianos y enzimas generadoras de oxidantes tales como elastasa de neutrófilos (NE), mieloperoxidasa (MPO), NADPH oxidasa (NOX) y óxido nítrico sintetasa (NOS) entre otras. En un principio se pensó que estas estructuras eran beneficiosas para el organismo, ya que su única función era la de atrapar al patógeno. Sin embargo, un exceso de NETs ha sido detectado en neutrófilos circulantes y de líquido sinovial, en nódulos reumatoides de pacientes con AR. Además, se ha observado una estrecha relación entre el ADN circulante (proveniente de estas estructuras) con parámetros inflamatorios (proteína C reactiva (PCR), velocidad de sedimentación globular (VSG), e IL-17) y autoinmunidad (ACPAs) en la AR ^{44,45}. Además, se ha observado que las NETs contienen elevadas cantidades de PAD (peptidil arginina deaminasa) 2 y PAD4, que son las enzimas encargadas de deaminar a las argininas y convertirlas en citrulinas. Por lo que las NETs podrían ser soporte para la citrulinación de proteínas en la AR. Así, se ha demostrado que las NETs en AR son fuentes de autoantígenos citrulinados. Las primeras que son susceptibles a ser citrulinadas son las histonas ya que igualmente son componentes de las NETs. Otras proteínas que se han encontrado citrulinadas integrantes de las NETs son la vimentina y la α -enolasa, todas ellas diana de

anticuerpos ACPA^{44,46}. Se ha propuesto un modelo del papel patogénico de la NETosis en la AR (figura 5): Consiste en un loop, en el que citoquinas inflamatorias y autoanticuerpos (FR y ACPA) activarían al neutrófilo que produciría NETs. Como ya hemos visto estas NETs son fuentes de antígenos citrulinados, lo que conllevaría a la producción de más autoanticuerpos. Estas NETs son capaces de activar a los fibroblastos sinoviales que producirían mediadores inflamatorios que a su vez volverían a activar a los neutrófilos a producir NETs provocando el daño en la articulación⁴⁴.

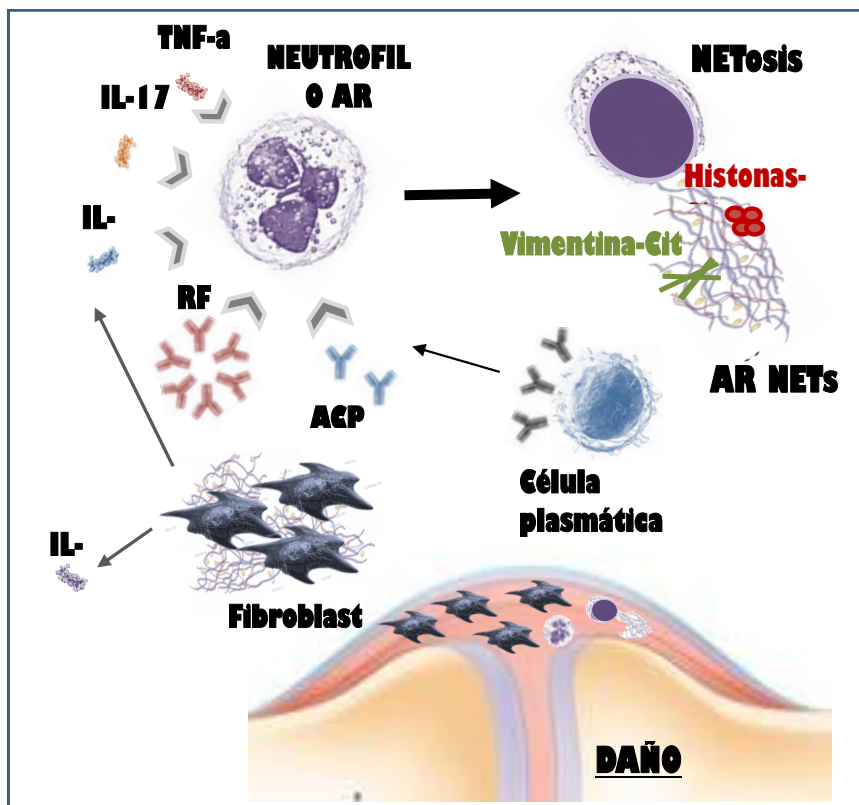


Figura 5. Modelo propuesto del papel patogénico de la NETosis en la AR. Los autoanticuerpos (FR y ACPA) y las citoquinas inflamatorias (IL-17A, TNF- α e IL-8) activarían al neutrófilo, actuando como estímulos potenciales para la producción de NETs. Las NETs de AR externalizan diversas moléculas inmuno-estimuladoras y son fuente de autoantígenos citrulinados (incluyendo vimentina e histonas), también promueven la activación y la liberación de citoquinas por fibroblastos sinoviales y células B, con implicaciones para el daño de las articulaciones y la propagación de un círculo vicioso de la inducción de NETosis y la formación de autoanticuerpos. (Modificada de Corsiero et al., 2016 *Front Immunol.* 2016; 14;7:48 [44])

Además, recientemente se ha identificado un nuevo tipo de granulocitos en AR con menos densidad, del tamaño de las células mononucleares (linfocitos y monocitos) y por eso se les llamo *low density granulocytes* (LDGs). Se cree que pueden originarse directamente a partir de su precursor mieloide o por diferenciación de los granulocitos maduros (figura 6). Estas células son altamente inflamatorias, producen elevados niveles de interferón (IFN) γ e inducen citotoxicidad en el endotelio conduciendo al daño vascular. Lo más importante de estas células es que son mucho más susceptibles de producir NETs que los neutrófilos normales, generando todos los efectos descritos anteriormente como el aumento de la exposición de antígenos, aumento de la inflamación, exposición de moléculas trombóticas, activación de otras células inmunes conduciendo al daño vascular, riesgo de aterotrombosis y perpetuación de la enfermedad ⁴⁷

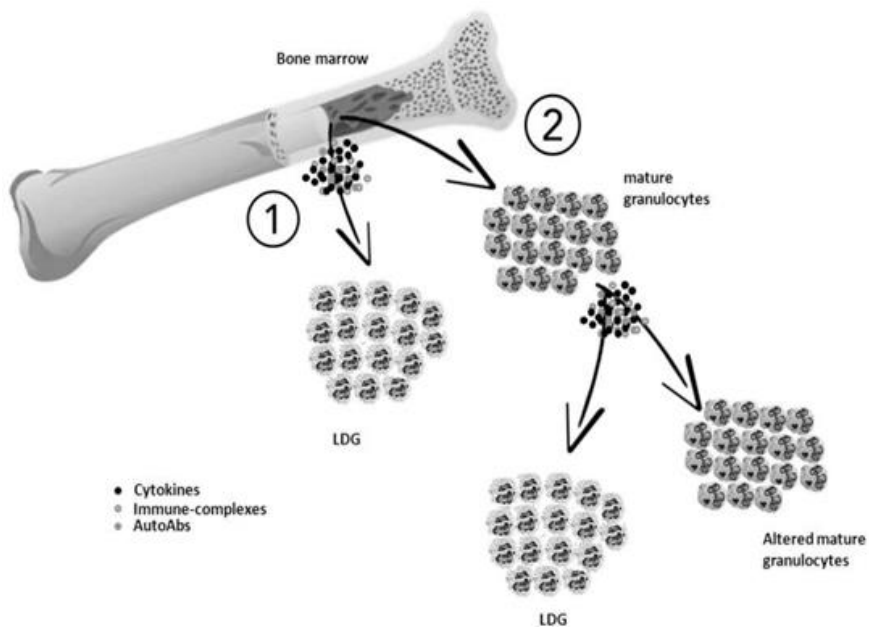


Figura 6. Representación esquemática de los posibles orígenes de los LDGs. Se cree que los LDGs (*low density granulocytes*) pueden originarse directamente a partir de su precursor mieloide o por diferenciación de los granulocitos maduros. Estas células son altamente inflamatorias, produciendo elevados niveles de IFN γ e induciendo citotoxicidad en el endotelio conduciendo al daño vascular. Estas células son mucho más susceptibles a producir NETs que los neutrófilos normales. (Tomado de Carmona-Rivera et al . *Semin Immunopathol* 2013; 33 (4):455-63) [⁴⁷]

5. PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA AR

Las citoquinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular con una vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, y que actúan como mediadores fundamentales en la transmisión de señales intercelulares. La secreción de citoquinas constituye un mecanismo fundamental en la modulación de la respuesta inmunológica. De forma general, la inflamación característica de la AR es debida a la predominancia de citoquinas proinflamatorias, que actúan como moléculas efectoras. Las células en la membrana sinovial inflamada y en el pannus secretan citoquinas, como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 e IL-23, que contribuyen a la inflamación y que pueden afectar directamente al hueso ⁴⁸. De entre las citoquinas producidas por los diferentes tipos celulares implicados en la fisiopatología de la AR, describimos a continuación de forma breve el papel de algunas de ellas, con una demostrada implicación en el desarrollo de la enfermedad.

El TNF- α y la IL-6 son citoquinas proinflamatorias que actúan sinérgicamente como moléculas efectoras fundamentales y son los principales componentes del proceso inflamatorio ⁴⁹. El TNF- α es un mediador clave para la producción de otras citoquinas, metaloproteinasas, óxido nítrico y prostaglandina E2, entre otras. Es secretado por diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B y fibroblastos y estimula a gran cantidad de células, promoviendo la inflamación.

La IL-1 β participa en la destrucción del cartílago y el hueso subcondral a través de la secreción de metaloproteinasas, la disminución de la síntesis de glucosaminoglicanos, etc.

La IL-23 tiene efectos proinflamatorios y promueve respuestas inflamatorias de modo sinérgico con la IL-12. Es uno de los factores esenciales para la supervivencia y/o expansión de los linfocitos Th17 y, por otra parte, induce la secreción de IL-17 por células no-T. La interacción entre la IL-23 y la IL-17 desempeña un papel fundamental tanto en las fases precoces de la AR como en la fase destructiva, ya que induce la expresión del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) en precursores mieloides y de su ligando, el RANKL, en los linfocitos Th. Además, la IL-23 estimula la producción de IL-1 β y TNF- α ⁵⁰.

La IL-18 estimula la activación de los linfocitos T citotóxicos y células *Natural Killers* (NK) ⁵¹, induciendo a su vez la secreción de IFN- γ por dichas células.

La IL-27 se produce en las CPA en presencia de infección e INF- γ . Induce efectos pleiotrópicos sobre diversas células del sistema inmunológico y tiene propiedades pro- y antiinflamatorias. Aumenta la patología autoinmunitaria, suprime la actividad patogénica Th17 y estimula la proliferación dependiente de STAT3 (de sus siglas en inglés signal transducer and activator of transcription 3) ⁵².

La IL-32 es una citoquina proinflamatoria que se ha encontrado en células NK y en linfocitos T activados.

La IL-35 es una citoquina perteneciente a la familia de la IL-12; se produce en los linfocitos T CD4+ reguladores y se ha demostrado que, in vitro, es capaz de inhibir la actividad de los linfocitos Th 17 y de suprimir la producción de células T CD4+ efectoras.

Otras citoquinas importantes en la patogenia de la AR son el factor estimulador del linfocito B (BLyS) y el ligando inductor de la proliferación del linfocito B (APRIL). El bloqueo de estas citoquinas podría ser importante en el tratamiento de la AR ⁵³.

LA IL-6 EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA AR

La IL-6 es una citoquina implicada en muchos aspectos de la inflamación asociados a la AR, incluyendo la respuesta de fase aguda, la diferenciación de células B, la producción de anticuerpos, la proliferación de células T, la activación de células endoteliales y la expresión y activación de los osteoclastos y del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) ^{54,55}. Es una de las citoquinas más abundantes en el suero y líquido sinovial de las articulaciones inflamadas de pacientes con AR y se ha asociado con la actividad de la enfermedad, la destrucción articular y las manifestaciones sistémicas ⁵⁶. Mediante su capacidad pleitrópica interviene en múltiples funciones de diferentes sistemas patofisiológicos como la fiebre, respuestas de fase aguda y la transición de respuesta inflamatoria aguda a crónica, ya que niveles elevados de IL-6 estimulan y facilitan las interacciones entre el sistema inmunitario innato y adaptativo ⁵⁶⁻⁵⁸. Su papel sobre la inmunidad

adaptativa ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, de hecho tiene un papel en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de autoanticuerpos, participa en la patogénesis de la artritis a través de la formación de inmuno-complejos (IC) ⁵⁹ y niveles elevados de la misma pueden causar un desequilibrio de células Th17 y T reguladoras, propio de la AR. Por consiguiente, la alteración de linfocitos B y T mediados por IL-6 puede conducir a una producción anormal de citoquinas inflamatorias, quimiocinas y metaloproteasas tanto por leucocitos como por células del estroma sinovial, que conduce a la destrucción del tejido sinovial y erosiones óseas. Los sinoviocitos tipo fibroblasto activados por la IL-6 desempeñan una función clave en la inflamación crónica y destrucción articular en la AR.

Por otro lado niveles elevados de IL-6 parecen tener un papel importante en la amplificación de la respuesta inflamatoria. En la figura 5 se resume la interacción mediada por IL-6 entre las células residentes del estroma sinovial y las células de la inmunidad innata. La IL-6 en presencia de su receptor soluble induce la producción de CXCL8 por parte de los sinoviocitos en la AR. CXCL8 induce quimiotaxis y activación de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), la IL-6 actúa prolongando la supervivencia de estas células. Las proteasas presentes en el líquido sinovial mejoran el desprendimiento de receptor soluble de IL-6 de la membrana plasmática de los PMN, aumentando la actividad de la IL-6 en los sinoviocitos ⁶⁰. La IL-6 también desempeña un papel directo en la quimiotaxis de monocitos y en la diferenciación de los monocitos hacia los macrófagos ^{61,62}.

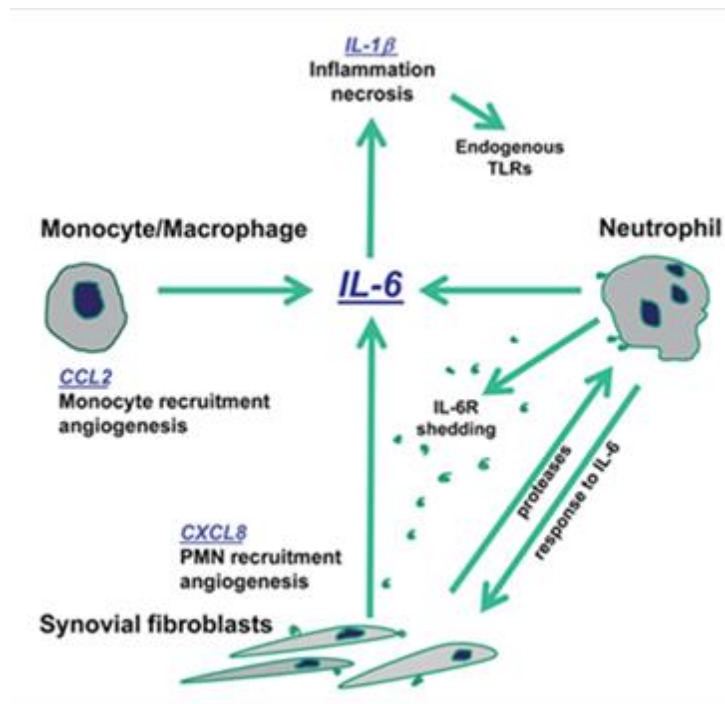


Figura 7: Amplificación de la respuesta inflamatoria de la IL-6. La IL-6 en presencia de su receptor soluble induce la producción de CXCL8, que facilita la quimiotaxis y activación de los PMNs, también puede mejorar la angiogénesis y contribuir a la quimiotaxis de las células mononucleares. Las proteasas presentes en el líquido sinovial mejoran el desprendimiento de sIL-6R de la membrana plasmática de PMNs, aumentando la actividad de IL-6. La liberación de ligandos de TLR endógenos al líquido sinovial contribuye a la amplificación de la inflamación local. (Imagen tomada de Ivan Caiello et al. *PLOS ONE* 9(10):e107886 · October 2014) [60]

Así mismo, niveles elevados de IL-6 desempeñan un papel clave en las manifestaciones sistémicas de la AR, tales como: la alteración del metabolismo lipídico mediante interacciones con el tejido adiposo; inflamación sistémica, a partir de sus acciones sobre el hígado, lo que aumenta la PCR y el amiloide A sérico contribuyendo a la disfunción endotelial vascular; hiposideremia a partir de la inducción de la hepcidina, siendo una posible causa de anemia y fatiga; activación de osteoclastos con la consecuente pérdida generalizada de densidad mineral ósea, etc. ⁶³⁻⁶⁵

COMORBILIDADES ASOCIADAS A LA AR: ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Como hemos comentado, la AR puede afectar también otros órganos o sistemas, induciendo inflamación y fibrosis, arteriosclerosis (AT) precoz o manifestaciones sistémicas, como astenia, anemia y osteoporosis, causa importante de comorbilidad y mortalidad en estos pacientes, contribuyendo la IL-6 en gran medida al desarrollo de las mismas (Figura 8). Entre las comorbilidades asociadas se incluye la enfermedad cardiovascular (CV), causando de un 39 a un 50 % de muertes (Tasa de mortalidad estandarizada, aproximadamente 1,5),⁶⁶ incluyendo infarto agudo de miocardio (IAM), eventos cerebrovasculares e insuficiencia cardíaca.^{67,68}

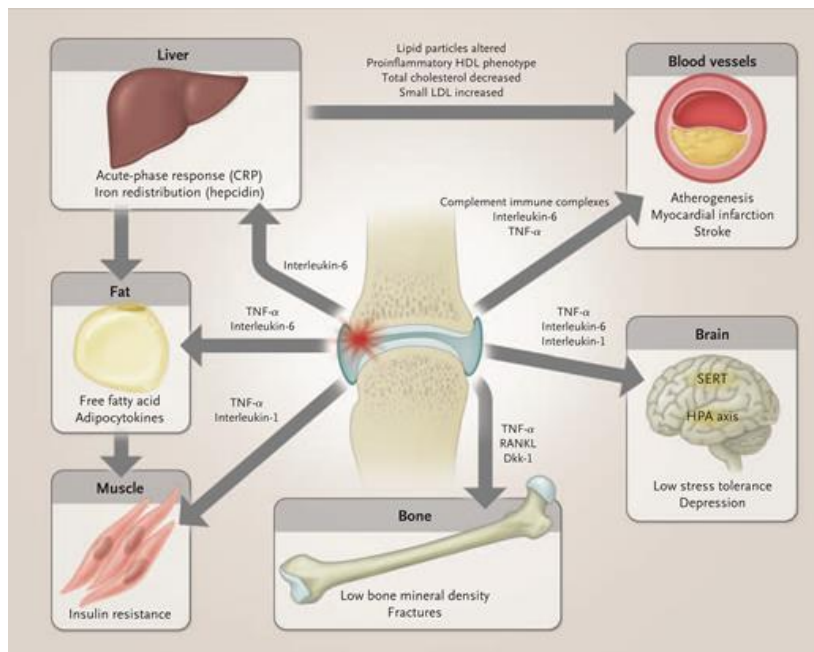


Figura 8. Mecanismos que influyen en las comorbilidades de la AR. Mediadores inflamatorios incluyendo: citoquinas, inmunocomplejos, reactantes de fase aguda y partículas del metabolismo lipídico alteradas, incrementan la activación endotelial y potencian la formación de placas ateromatosas inestables; Además actúan sobre diferentes órganos dando lugar a manifestaciones sistémicas, como astenia, anemia, resistencia a la insulina y osteoporosis. (Tomado de Iain B. McInnes. *New England Journal Med* 2011; 365:2205-19) [1].

Este aumento de mortalidad no se explica solamente por los factores de riesgo cardiovascular tradicionales ^{66,69}, el uso de glucocorticoides o antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ni a los factores genéticos, sino que también están implicadas las diferentes vías inflamatorias, dónde la IL-6 y el TNF α juegan un papel fundamental, así como los reactantes de fase aguda (RFA), los inmunocomplejos y la alteración del perfil lipídico que aumentan la activación endotelial y hacen que las placas ateromatosas sean potencialmente inestables⁷⁰. La aterosclerosis en estadios iniciales de la enfermedad se considera una potencial manifestación preclínica. De hecho, el riesgo de eventos CV como infarto agudo de miocardio (IAM) es mayor en los dos años anteriores al diagnóstico definitivo de la AR, tal vez reflejando la inflamación subclínica de estos pacientes ⁷¹⁻⁷³. Una vez la enfermedad está establecida y se diagnostica, el riesgo de tener placas carotídeas y eventos CV aumenta con la progresión y la duración de la enfermedad ⁷⁴. Así, el aumento mantenido de RFA se ha considerado un factor de riesgo cardiovascular independiente en la población general ⁷⁵. Por tanto un tratamiento eficaz que controle estos fenómenos inflamatorios disminuye el riesgo cardiovascular y modifica favorablemente la fisiología vascular ⁷⁶⁻⁷⁸.

FACTORES INVOLUCRADOS

1. INFLAMACION

Como hemos comentado, en las enfermedades autoinmunes, tales como la AR, hay un mayor riesgo de sufrir eventos CV sin que medien factores de riesgo tradicionales previos que los justifiquen como la hipertensión, la diabetes y la obesidad. El análisis de los mecanismos que llevan al desarrollo de una AT prematura y/o acelerada en estas patologías permite establecer similitudes entre la aterogénesis y los procesos inflamatorios crónicos que caracterizan a estas enfermedades: incremento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, aumento del reclutamiento de células proinflamatorias y activación de macrófagos, aumento en la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y otros factores inflamatorios que interrelacionan los distintos tipos celulares. Así, la presencia de una enfermedad autoinmune constituye un factor de riesgo aterogénico de gran

peso, ya que, aumenta la probabilidad de un evento trombótico en mayor grado y en menor tiempo que los factores de riesgo tradicionales.

Por otro lado, existe una estrecha relación entre los niveles de ACPAs y la inflamación, ya que actúan como inductores directos del estado pro-oxidativo y del perfil inflamatorio y aterogénico de los linfocitos, monocitos y neutrófilos en pacientes con AR ⁷⁹. Muchos componentes celulares pueden considerarse como elementos clave del estado inflamatorio y proaterotrombótico en estos pacientes. Entre ellos, los macrófagos han demostrado desempeñar un papel muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis. Varios parámetros de los monocitos circulantes, incluyendo el recuento, el aumento de las propiedades adhesivas, las alteraciones del metabolismo lipídico, la fagocitosis y el colesterol- LDL (del inglés *low density lipoprotein*), se asocian con enfermedad CV ^{80,81}.

Además, los monocitos y macrófagos tienen un papel fundamental en la inflamación y se ha observado que son activados en la AR a través de la liberación de citoquinas y la infiltración masiva en los sitios inflamatorios, tales como las membranas sinoviales ^{63,82}. En definitiva, la generación progresiva de monocitos inflamatorios es un elemento intrínseco en la respuesta inmunomediada en AR ⁸³ y esta respuesta proporciona depósitos lipídicos con células efectoras que aceleran el desarrollo de enfermedad vascular aterosclerótica ⁸⁴. Por lo tanto, los tratamientos dirigidos a monocitos-macrófagos podrían contribuir a prevenir con eficacia eventos cardiovasculares.

De modo resumido, la secuencia de inicio de formación de la placa aterosclerótica en estos pacientes implicaría la activación de las células endoteliales por efecto de los autoanticuerpos, con la consecuente expresión de moléculas de adhesión que favorecería el reclutamiento de monocitos y linfocitos. Los monocitos activados migran hacia la íntima arterial, donde por acción de los complejos anticuerpos/ LDL-oxidados (-ox) se vería incrementada la absorción de LDL-ox, conduciendo a la formación de células espumosas. Estas células, junto a los linfocitos T producirían citoquinas, factores de crecimiento, TF, etc., promoviendo la proliferación de las células musculares lisas y la potenciación del proceso aterosclerótico (Figura 9).

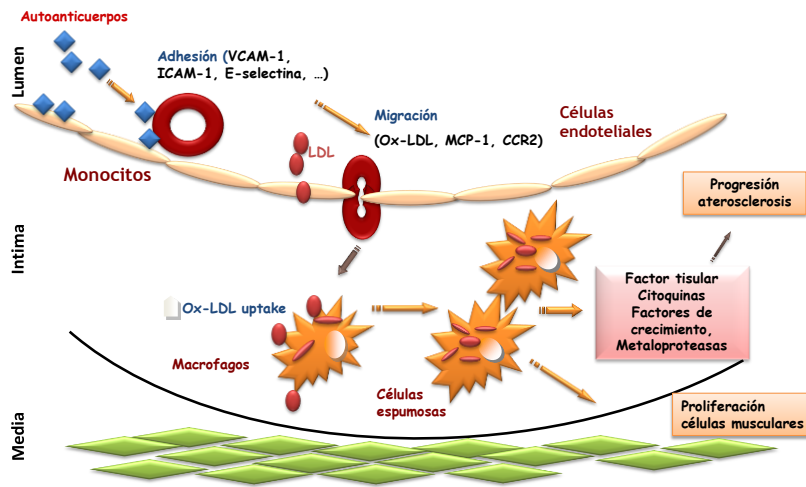


Figura 9. Papel de los monocitos en la respuesta inmunomediada en AR. (Adaptado de Lopez-Pedra et al., *Rheumatology* 2016, 55(12): 2096-2108) [84]

2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y ATROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una respuesta inflamatoria crónica de la pared arterial iniciada por la lesión del endotelio y mantenida por la interacción entre lipoproteínas, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y los componentes de la pared arterial (músculo liso y matriz extracelular). Los nuevos conceptos relacionados con la patogenia de esta enfermedad, donde la inflamación generada por un mecanismo inmunológico se considera determinante, han permitido considerar que un proceso autoinmune esté involucrado en su inicio y perpetuación ⁸⁵, tal es el caso de la AR y otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y el síndrome antifosfolípido que han sido objeto de estudio en los últimos años en relación con su asociación a una mayor incidencia de aterosclerosis. El desarrollo de enfermedad CV en estas patologías implica factores genéticos, así como otros factores de riesgo adquiridos (p.ej. hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensión). Los componentes inflamatorios de la respuesta inmune (principalmente interleuquinas, TNF α e IFN γ), el estrés

oxidativo, así como elementos autoinmunes (p.ej. autoanticuerpos, autoantígenos y linfocitos autoreactivos) parecen estar también implicados en estos procesos ⁸⁶.

La inflamación y la trombosis son elementos esenciales en la secuencia de eventos que conducen a la formación de la placa arteriosclerótica, su crecimiento y eventual ruptura, con la consiguiente producción de eventos cardiovasculares. Estudios celulares y moleculares recientes han demostrado que dentro de la placa arteriosclerótica los mecanismos proinflamatorios y protrombóticos están íntimamente asociados. En enfermedades autoinmunes sistémicas se han propuesto numerosas teorías para explicar dichos mecanismos, aunque la patogénesis parece ser multifactorial.

El endotelio juega un papel importante en la regulación del tono vascular, la actividad plaquetaria y los mecanismos de trombosis. Las propiedades del endotelio en condiciones normales permiten que se mantenga un equilibrio antitrombótico y anticoagulante. La lesión endotelial vascular es el evento primario en la aterosclerosis ⁸⁷, y se ha asociado con disfunción endotelial (DE) ⁸⁸. La DE es un mecanismo variable en la predicción del desarrollo de eventos CV posteriores.

Los mecanismos responsables para el desarrollo de aterosclerosis prematura en AR no son bien conocidos, pero se sabe que los factores de riesgo tradicionales por sí solos no son suficientes, por lo que se ha sugerido que la inflamación tiene un papel en este proceso ⁸⁹. Por ello es probable que los mediadores inflamatorios puedan ser la causa de la aterosclerosis acelerada observada en esta enfermedad autoinmune, que junto con las anomalías metabólicas asociados con la inflamación sistémica de estos pacientes produce secundariamente DE y enfermedad CV (Figura 10).

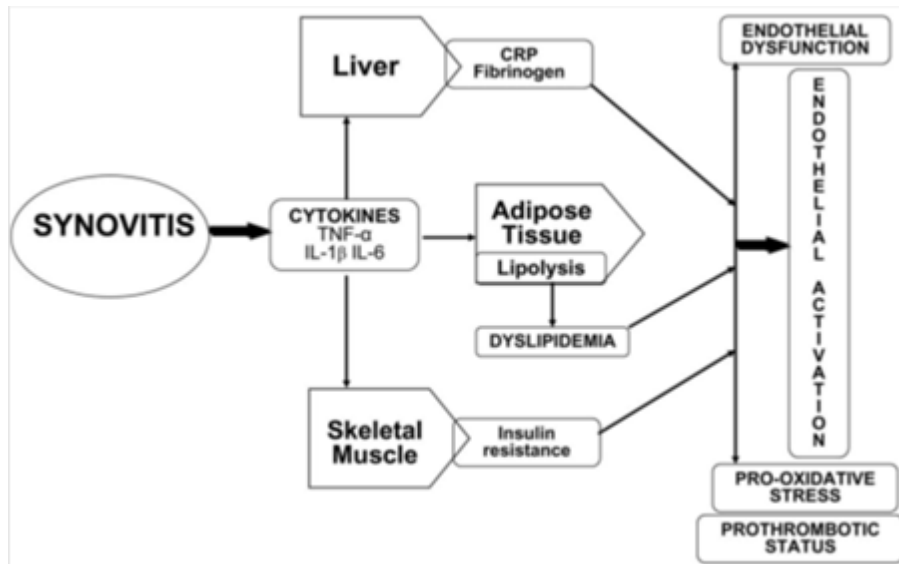


Figura 10. Representación esquemática de los mecanismos implicados en la aterogénesis acelerada en AR. Las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6, generadas en el tejido sinovial, pasan a la circulación y actúan a diferentes niveles, en el tejido adiposo producen lipólisis y dislipidemia, en el músculo esquelético resistencia insulínica y a nivel hepático aumento de PCR y fibrinógeno, todo ello contribuye a la activación endotelial, favoreciendo el estrés prooxidativo y el status protrombótico así como disfunción endotelial. (Tomado de Gonzalez-Gay MA et al., *Semin Arthritis Rheum* 35:8-17. 2005) [90]

La DE es una anomalía vascular presentada frecuentemente en pacientes con AR contribuyendo al inicio de la placa de aterosclerosis y a su progresión. Está asociada con el engrosamiento de la íntima media en los pacientes con AR de larga evolución^{91,92}. Las características fenotípicas de la DE incluyen la expresión regulada de las moléculas de adhesión celular, el compromiso de la función de barrera que conduce a un aumento de la diapédesis leucocitaria, a un aumento del tono del músculo liso vascular secundario, a la producción anómala de sustancias vasodilatadoras tales como óxido nítrico (NO) y prostaciclina, así como a un aumento de la producción de sustancias vasoconstrictoras incluyendo endotelina⁹³. Clínicamente la función endotelial puede determinarse de diferentes formas, la vasodilatación postoclusión de la arteria braquial, medida por flujo (VDMF) mediante ultrasonografía braquial de alta sensibilidad, es el método más comúnmente utilizado a día de hoy, dado su alta sensibilidad y carácter no

invasivo. Es una técnica validada y muy utilizada en el ámbito de la investigación, sin embargo puede tener variabilidad inter-observador, por lo que se han descrito métodos estandarizados para aumentar su precisión⁹⁴.

3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres que generan daño oxidativo en las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes. En condiciones fisiológicas normales, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son producidas por la mitocondria como resultado del metabolismo aerobio, los peroxisomas celulares en procesos de detoxificación o la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase*) de las células fagocíticas, como sistemas de señalización celular y como medio del sistema inmunitario para eliminar patógenos. Las principales especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno son⁹⁵: radical superóxido (O_2^-); radical hidropéroxido (HO_2); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); radical hidroxilo (HO); radical alcoxi (RO); radical peroxi (ROO); óxido nítrico (NO); dióxido de nitrógeno (NO_2). En individuos sanos, las especies reactivas y radicales libres son eliminados o neutralizados por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, cuando este equilibrio se pierde, por ejemplo, por procesos inflamatorios o autoinmunes, se incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, conduciendo a un daño en los componentes celulares. Esto es lo que ocurre frecuentemente en la AR, desempeñando un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis.

Nuestro grupo ha descrito previamente un estado pro-oxidativo y un deterioro de la capacidad antioxidante en pacientes con esta enfermedad tanto a nivel plasmático como celular (81), existiendo un desequilibrio a favor de las especies reactivas y radicales libres, que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes, mostrando despolarización mitocondrial, aumento de especies de oxígeno reactivo y de peroxinitrito, y menor nivel de GSH en neutrófilos y monocitos de estos pacientes.

Por otro lado, el estrés oxidativo desempeña un papel central en la dislipidemia ^{96,97}, y contribuye a la inflamación crónica de los tejidos, conduciendo al desarrollo de enfermedades autoinmunes ^{84,98,99}. Existe una evidencia creciente que sugiere que el estrés oxidativo podría utilizarse para el diagnóstico precoz de AR ¹⁰⁰.

En un trabajo realizado por Mikulspor et al., se demostró la importancia del estrés oxidativo en el desarrollo de autoinmunidad específica en individuos con AR genéticamente susceptibles. Así, se asoció la delección de una enzima antioxidante (glutathione S-transferase Mu-1) con la positividad para ACPAs ¹⁰¹. Otro estudio llevado a cabo posteriormente mostró un aumento de la actividad oxidante sinovial en pacientes con AR ACPA positivo en comparación con los negativos ¹⁰².

En la misma línea, en un trabajo más reciente llevado a cabo por nuestro grupo ⁷⁹ se demuestra la importancia de los ACPAs en el estado inflamatorio y proaterogénico de los pacientes con AR.

4. NETOSIS

Un gran número de procesos se han relacionado con el desarrollo de DE y aterosclerosis, entre ellos el incremento de NETosis se ha propuesto como un mecanismo potencial en la aparición de eventos CV.

La formación de NETs puede inducir DE y daño vascular en pacientes con AR a través de la estimulación de la respuesta inflamatoria que comprende el incremento de moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas, conduciendo así el desarrollo de aterosclerosis acelerada y enfermedad CV ^{44,103,104}.

El papel de las NETs en la aterotrombosis se ha demostrado recientemente, ya que se ha descrito que estas redes son fuente de factor tisular (TF, del *inglés tissue factor*). De tal manera que una alteración en la producción de NETs, aumentaría los niveles de TF en sangre y con ello la generación de trombina y la activación plaquetaria, favoreciendo la formación del trombo y teniendo un efecto negativo en la placa aterosclerótica induciendo su ruptura ¹⁰⁵ (figura 11). Asimismo, la generación de NETs ha sido reconocida como un importante activador de la cascada de la coagulación, asociándose con el desarrollo de trombosis venosa profunda ¹⁰⁶. Las NETs pueden regular la

trombosis a través de varios mecanismos: interactuando con plaquetas y hematíes, promoviendo la adhesión y agregación de proteínas efectoras (tales como TF y el factor de von Willebrand)¹⁰⁷⁻¹¹⁰ e induciendo daño vascular^{111,112}.

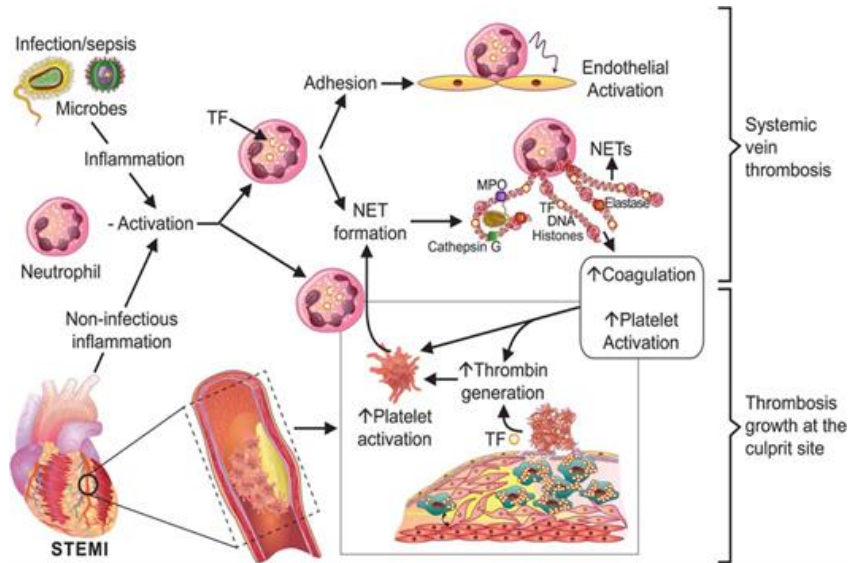


Figura 11. Contribución de los neutrófilos a la aterotrombosis a través de la liberación de NETs. La activación de los neutrófilos en respuesta a un estímulo inflamatorio (infeccioso o no) induce la liberación de NETs, las cuales son fuente de factor tisular (TF, del inglés *tissue factor*) entre otras moléculas inflamatorias y enzimas. Al aumentar los niveles sistémicos de TF, éste promueve la generación de trombina (favoreciendo la trombosis venosa sistémica) y la activación plaquetaria, teniendo un efecto negativo en la placa aterosclerótica e induciendo su ruptura. (Tomado de Badimon L, Vilahur G. *Eur Heart J* 2015;36:1364–1366.)^[105]

TRATAMIENTO DE LA AR

El tratamiento de la AR ha evolucionado mucho en los últimos años debido en gran parte al avance de los diferentes fármacos disponibles y al desarrollo de estrategias más ambiciosas cuya meta debe ser la remisión, sobre todo en formas tempranas, o alternativamente un estado de bajo nivel de actividad clínica en formas establecidas. La estrategia “treat to target” se basa en la instauración precoz del tratamiento con fármacos inductores de remisión o modificadores de la enfermedad (FAMEs o DMARDs, del inglés *disease modifying antirheumatic drugs*) y de un seguimiento estrecho, en busca de disminuir el dolor y la actividad de la enfermedad, mejorar la calidad de vida y prevenir el daño articular irreversible ¹¹³. Todo esto ha permitido un mejor pronóstico de los pacientes ¹¹⁴.

Para conseguir este objetivo terapéutico debe iniciarse tratamiento con DMARDs convencionales o sintéticos (DMARDs-c) en cuanto se realice el diagnóstico de AR, según las recomendaciones del consenso actualizado de la Sociedad Española de Reumatología (SER) ¹¹⁵. Las opciones actuales de tratamiento para la AR incluyen AINES, glucocorticoides, DMARDs-c y DMARDs biológicos (DMARDs-b). Existen varios DMARDs-c como tratamiento inicial en pacientes con AR ¹¹⁶, incluyendo hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalazina, sales de oro y metotrexato (MTX) ¹¹⁷, que es el fármaco de elección inicial según este consenso, y en caso de intolerancia o contraindicación al mismo, se podría iniciar otros DMARDs sintéticos como la leflunomida o la sulfasalazina. Asimismo, se recomienda el uso de bajas dosis de glucocorticoides en el tratamiento inicial de la AR (en combinación con uno o más DMARDs sintéticos) durante los primeros meses y reducir la dosis progresivamente con el objetivo de su retirada definitiva. Aquellos pacientes con AR activa, de intensidad moderada-grave, que han fracasado a tratamiento con DMARDs convencionales a dosis adecuadas, son candidatos a recibir terapias biológicas.

Actualmente existen diferentes agentes biológicos para el tratamiento de la AR: cinco que bloquean el factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF α): infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab y golimumab; un inhibidor de la IL-1: anakinra; una proteína de fusión moduladora de la activación de

células T: abatacept; un anticuerpo monoclonal contra al antígeno CD20 de los linfocitos B: rituximab, y un anticuerpo monoclonal contra el receptor de la IL-6: tocilizumab.

La terapia anti-TNF α ha mejorado significativamente la perspectiva de los pacientes que sufren AR. Sin embargo una proporción sustancial de pacientes no responden a estas terapias, lo que implica que la respuesta al tratamiento es probablemente multifactorial ¹¹⁸, por eso se están llevando a cabo investigaciones de nuevas terapias. Como hemos comentado la IL-6 es una citoquina inflamatoria que desempeña un papel central en la propagación de la respuesta inflamatoria que induce la aterosclerosis ya que está implicada en la DE y en el endurecimiento arterial que contribuye al proceso de aterosclerosis acelerada en pacientes con AR ⁶³. Asimismo, desempeña un papel muy importante en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos que participan en la patogénesis de la AR a través de la formación de complejos inmunes (Figura 12) ¹¹⁹.

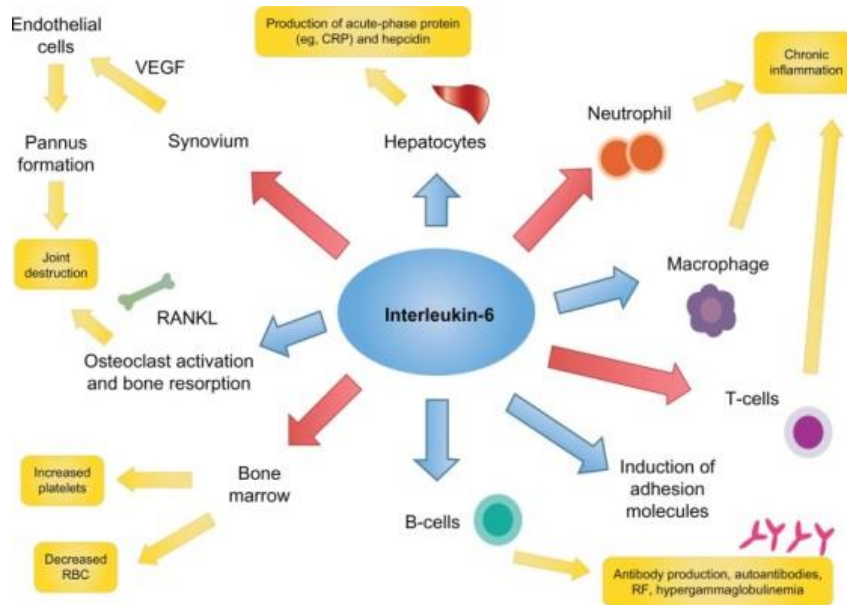


Figura 12. Vías Inflammatorias activadas por la interleukin-6. La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria pleiotrópica con gran variedad de efectos biológicos, a destacar: la regulación de la respuesta inmune, la inflamación, el metabolismo óseo, la hematopoyesis y la estimulación de la producción de quimiocinas y las moléculas de adhesión en los linfocitos, incluyendo las proteínas de fase aguda en los hepatocitos. (Abreviaturas: Proteína C Reactiva, del inglés CRP: *C-reactive protein*; Células rojas sanguíneas, del inglés RBC: *red blood cells*; Factor Reumatoide, del inglés RF: *rheumatoid factor*; factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés VEGF: *vascular endothelial growth factor*) (Tomado de Al-Shakarchi et al. *Patient Preference and Adherence* 2013;7 653–666) [116]

Los niveles elevados de IL-6 pueden causar un desequilibrio de las células Th1-Th17 / T-reg en pacientes con AR, lo cual se revierte tras tratamiento con tocilizumab (TCZ)^{120,121}, un anticuerpo monoclonal (mAb) recombinante humanizado del receptor de IL-6 que actúa uniéndose tanto al receptor soluble de IL-6 soluble como al receptor de membrana (sIL-6R y mL-6R), bloqueando los efectos pro-inflamatorios de IL-6¹²². (Figura 13)

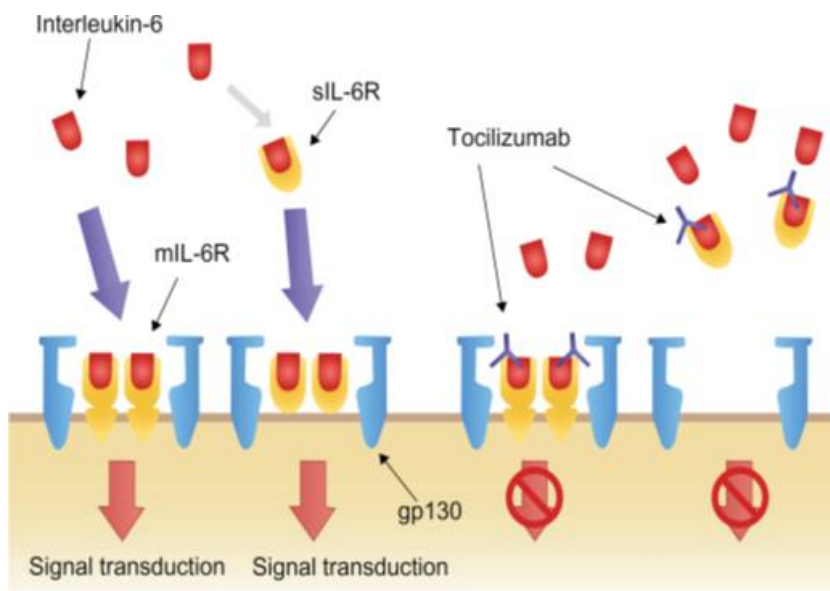


Figura 13. Transducción y bloqueo de la señal de la interleukina-6 por tocilizumab. (Abreviaturas: gp130: glicoproteína 130; mIL-6R: receptor de IL-6 unido a membrana; sIL-6R: receptor soluble de IL-6). (Tomado de Al-Shakarchi et al. *Patient Preference and Adherence* 2013;7 653–666) [¹¹⁶]

TCZ es el primer fármaco biológico para la AR que inhibe la IL-6. Se han realizado varias revisiones sistemáticas a partir de estudios multicéntricos aleatorizados que han demostrado la eficacia de este fármaco en AR. TCZ ha demostrado disminuir la actividad de la enfermedad, aumentar la calidad de vida e inhibir la progresión del daño radiológico en los pacientes afectados de esta enfermedad. También ha demostrado ser superior en monoterapia al MTX y otros FAMEs, así como su eficacia en pacientes naive o con fracaso terapéutico a otros tratamientos biológicos ^{123–134}. Sin embargo, sus efectos sobre el perfil aterotrombótico que presentan los pacientes AR aún no han sido analizados.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El tratamiento de la artritis reumatoide ha sufrido un espectacular avance en las últimas décadas gracias a la introducción de la terapia anti-TNF α que ha mejorado significativamente la perspectiva de los pacientes que sufren esta enfermedad. Sin embargo, una proporción sustancial de pacientes no responden a estas terapias, lo que implica que la respuesta al tratamiento es probablemente multifactorial, por eso se están llevando a cabo investigaciones con nuevas terapias.

La IL-6 es una citoquina clave en la cascada inflamatoria que acontece en estos pacientes, no sólo por su papel en la propagación de la respuesta inflamatoria, sino también por su implicación en las comorbilidades asociadas a la enfermedad, como en la disfunción endotelial y en el endurecimiento arterial que contribuye al proceso de aterosclerosis acelerada en pacientes con AR.

Se ha demostrado que la inhibición de esta citoquina mediante tratamiento con TCZ, (anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que actúa inhibiendo el receptor de IL-6), es un tratamiento efectivo para el control de la actividad inflamatoria de la enfermedad. Han sido múltiples los estudios llevados a cabo sobre el efecto de TCZ en la activación de linfocitos en pacientes con AR. Sin embargo, aún no ha sido analizado sus efectos sobre la actividad en monocitos, la alteración de los neutrófilos y estrés oxidativo, principales efectores de disfunción endotelial, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular en esta condición autoinmune.

Por tanto, la hipótesis de partida de nuestro trabajo es que la inhibición del receptor de IL-6 mediante TCZ podría mejorar el perfil proaterotrombótico en pacientes con AR mediante la regulación de la disfunción endotelial, estrés oxidativo y la actividad inflamatoria de monocitos y neutrófilos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es:

Investigar el efecto de TCZ sobre la disfunción endotelial y la alteración del estatus oxidativo, así como analizar los cambios moleculares en la actividad inflamatoria de los monocitos y los neutrófilos, principales mecanismos responsables del desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular en los pacientes con artritis reumatoide.

Objetivos específicos:

1. Analizar el efecto del TCZ sobre la actividad de la enfermedad, el perfil lipídico, reactantes de fase aguda y autoinmunidad en una cohorte de 20 pacientes AR.
2. Evaluar el efecto de TCZ sobre la disfunción endotelial mediante el análisis de la función microvascular y moléculas de adhesión celular en el plasma de pacientes AR y estudios *in vitro* en células endoteliales.
3. Analizar el efecto de TCZ sobre la alteración del estatus oxidativo en monocitos y neutrófilos de pacientes AR.
4. Estudiar el efecto del TCZ sobre la actividad inflamatoria del monocito mediante estudios *in vivo* en la cohorte de pacientes AR e *in vitro* con monocitos aislados de pacientes AR.
5. Analizar el efecto de esta terapia anti-IL6R en la generación de NETosis llevada a cabo por los neutrófilos mediante estudios *in vivo* en la cohorte de pacientes AR e *in vivo* con neutrófilos purificados de pacientes AR.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES

Los pacientes incluidos en este trabajo fueron pacientes caucásicos diagnosticados de AR según los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 o 2010^{135,136} en tratamiento con DMARDs convencionales, procedentes del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España), una vez obtenida la aprobación del comité ético del Hospital Reina Sofía de Córdoba (España). Los pacientes manifestaron su consentimiento informado por escrito.

Se incluyeron 20 pacientes con respuesta inadecuada o intolerancia a DMARDs-c y se les administró tocilizumab (162 mg) una inyección subcutánea semanal durante 6 meses. De los pacientes incluidos un 63.5 % estaban tomando metotrexato, un 30 % leflunomida y un 12.5 % hidroxicloroquina. Se permitió que los pacientes recibieran tratamiento concomitante con corticoides (62.5%), AINEs (75%) y vitamina D (18%). El tratamiento de los pacientes con estos fármacos se había mantenido estable al menos los 2 meses previos a la administración de tocilizumab y no se modificó durante el tratamiento con el mismo.

Los parámetros clínicos y de laboratorio incluidos en el protocolo consistieron en una evaluación clínica y analítica antes y después de 6 meses del tratamiento con tocilizumab. La evaluación clínica incluyó presencia de comorbilidades como obesidad, hipertensión arterial (HTA), diabetes (DM) ó hábito tabáquico. Contaje de articulaciones dolorosas (AD) e inflamadas (AI), valoración global y del dolor mediante escala analógica visual (EVA; rango de 0 a 100 mm) del paciente (VGP), evaluación de la actividad de la enfermedad siguiendo las guías e indicaciones del ACR mediante el DAS28 (tasa de actividad de la enfermedad, *disease activity score*, sobre 28 articulaciones). Todos los pacientes rellenaron el cuestionario de funcionalidad y calidad de vida HAQ (cuestionario de evaluación de salud, *Health Quality Questionnaire*).

La evaluación serológica incluyó valores de FR, ACPA, PCR, VSG, apolipoproteínas, triglicéridos, colesterol total (CT) y sus diferentes fracciones. Seis meses después del tratamiento con tocilizumab se analizaron los cambios en estos parámetros.

Tabla 1. Características clínicas y analíticas basales de los pacientes con Artritis Reumatoide incluidos en el estudio.

Parámetros clínicos	
Hombres /Mujeres (n/n)	16/4
Edad (años)	47.8± 2.30
Duración de la enfermedad (años)	7.6± 1.76
Niveles de FR	90.84± 25.22
Niveles de ACPA	761.09± 240.19
Obesidad (%)	6.10
Diabetes (%)	1
Hipertensión (%)	2
Menopausia (%)	50
Fumadores (%)	25
Daño articular	
Articulaciones inflamadas (n)	6.14± 1.01
Articulaciones dolorosas (n)	19.00± 4.58
DAS28	4.25± 0.18
EVA	71.5± 3.94
HAQ	1.54± 0.31
Perfil lipídico	
Colesterol Total (mg /dl)	180.00 ± 9.33
HDL Colesterol (mg/dl)	19.00± 4.58
LDL Colesterol (mg/dl)	115.30± 8.83
Triglicéridos (mg/dl)	94.00± 8.70
Apolipoproteína A1	130.80 ± 5.68
Apolipoproteína B	73.60± 4.44
ApoB/ApoA ratio	0.57± 0.051
Parámetros inflamatorios	
VSG (mmh)	25.40± 6.09
PCR (mg/dl)	13.29± 6.08
Tratamientos	
Corticoides (%)	62.5
Hidroxicloroquina (%)	12.5
AINES (%)	75
Metotrexato (%)	63.5
Leflunomida (%)	30
Vitamina D (%)	18

Los valores son media ± Desviación Estándar (DESVEST). HDL= Lipoproteína de alta densidad; LDL= Lipoproteína de baja densidad; DAS=Tasa de actividad de la enfermedad; ACPA = anticuerpos anti-peptidos cíclicos citrulinados; VSG= Velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C reactiva; AINES= Antiinflamatorios no esteroideos; FR= Factor Reumatoide

DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

El estudio de la función microvascular endotelial se realizó a través de la prueba de hiperemia reactiva post-oclusiva (PORH) realizada con un Laser-Doppler linear Periflux 5010 (Perimed, Järfalla, Stockholm, Suecia), analizando el aumento del flujo sanguíneo tras la oclusión temporal del mismo utilizando una sonda cutánea en el antebrazo. Las medidas las llevó a cabo el mismo investigador para evitar variabilidad en los resultados. Específicamente, con los participantes del estudio sentados en una habitación con una temperatura estable (25-26°C), un manguito de compresión (Hokanson, Bellevue, Washington, Estados Unidos) fue situado 5 cm por encima del codo y una sonda receptora en el antebrazo, 2 cm por encima de la muñeca en el mismo brazo. Tras un periodo de 5 minutos de descanso, el flujo capilar basal se midió durante 2 minutos. Tras esto, se aumentó la presión del manguito hasta una presión suprasistólica (180 a 220 mm Hg) y se mantuvo durante 4 minutos. A continuación, se liberó la presión rápidamente del manguito y el flujo se registró durante 3 minutos. Los datos obtenidos se analizaron usando el software PeriSoft para Windows. El software calcula diferentes parámetros entre los que se encuentran: el valor inicial de perfusión normal (RF), el valor máximo de perfusión cuando se ocluye (BZ), el área de oclusión (AO), el tiempo que tarda en llegar a la mitad del valor antes de la hiperemia (TH1), el flujo máximo de perfusión tras la oclusión (PF), el tiempo que tarda en llegar a la mitad después de la hiperemia (TH2) y el área de hiperemia.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS BLANCAS

Los neutrófilos fueron aislados de los pacientes con AR por centrifugación de densidad (Dextran, Ficoll-Hypaque). Esta técnica está basada en el mismo método que el Ficoll-Hypaque pero con un paso previo con la adición de dextrano que hace que los neutrófilos tengan la misma densidad que los leucocitos mononucleados. Se mezcla toda la sangre en un tubo y se añade igual cantidad de dextrano al 3%. Se incuba a 4°C durante 45 minutos. Tras la incubación se observarán dos fases en el tubo: la superior con los leucocitos y la inferior con los hematíes. Se recoge la parte superior y se añade en un tubo con la mitad de ficoll que la añadida de dextrano. Los neutrófilos quedarán bajo el ficoll formando un pellet y las células mononucleadas formarán un halo sobre el mismo. Se recoge el halo y se añade a un tubo con 10 ml de buffer fosfato salino (PBS) y se realiza un lavado. Posteriormente se decanta el ficoll. Los neutrófilos se sometieron a un choque osmótico, resuspendiéndolos en 2 ml de agua durante 5 seg

A continuación se añadieron 2 ml de cloruro sódico al 1,8% para conseguir un medio isotónico. Se centrifugaron a 1.800 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se repitió la decantación y este último proceso. Se añaden 500 µl de PBSy se centrifuga de nuevo a 1.800 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Por último se resuspendieron en 12 ml de PBS y se contaron las células mezclando 15 µl de azul Tripan con 15 µl de la suspensión con los neutrófilos.

Posteriormente, se realizó la separación de monocitos y linfocitos a partir de la capa de células mononucleares de sangre periférica, obtenidas por centrifugación en un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque. Los monocitos se aislaron de esta fracción mediante depleción inmunomagnética en columna, utilizando un kit comercial (Monocyte isolation kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Consiste en añadir anticuerpos unidos a una molécula magnética a las células y hacerlas pasar por una columna con una matriz de esferas ferromagnéticas, Tras colocarse en un separador magnético, las esferas amplían su campo magnético lo que induce un alto gradiente en la columna permitiendo la selección de las células a las que se les ha adherido el anticuerpo.

La pureza de las fracciones se evaluó mediante citometría de flujo (Citómetro FACS calibur), analizando el tamaño y la complejidad de cada población . La pureza de los monocitos se evaluó adicionalmente con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) - anticuerpo anti - CD14 conjugado por citometría de flujo. Por este método, se obtuvieron $95,2 \pm 4,3$ células monocíticas viables.

TRATAMIENTOS IN VITRO DE MONOCITOS, NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES

Monocitos y neutrófilos aislados de 5 pacientes con AR a tiempo basal se cultivaron en RPMI 1640 que contenía 10% de FBS, 2 mM de l-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y 250 µg/ml de fungizona (BioWhittaker / MA Bioproducts, Walkersville, Maryland, EE.UU.) a 37 ° C en una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) humidificado al 5%.

Para el análisis de la expresión de ARNm y proteínas, los monocitos (1×10^6 células/ml) fueron pretratados con solución bloqueante FCRII (Miltenyi Biotec) durante 15 min. A continuación, las células se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Posteriormente, las células se sembraron y se incubaron con IL-6 (10 ng/ml) durante 9 horas, tras este tiempo se incubaron otras 9 horas en presencia o en

ausencia de tocilizumab (20 µg/ ml) a 37 ° C en una atmósfera humidificada al 5% (CO₂).

Por otra parte, los neutrófilos (1 x 10⁶ células/ml) se pretrataron con solución bloqueante FCRII como se ha descrito anteriormente. A continuación, las células fueron sembradas y se incubaron con IL- 6 (10 ng/ml) durante 3 horas, y después se incubaron de nuevo en presencia o en ausencia de tocilizumab (20 µg/ml) durante otras 3 horas, a 37 ° C en una atmósfera humidificada al 5% (CO₂).

La línea celular endotelial de vena de cordón umbilical (HUVEC, Lonza Group Ltd, Basel, Suiza) se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en medio de crecimiento endotelial (EGM, por sus siglas en inglés) consistente en medio basal para células endoteliales (EBM (*endothelial cell basal médium*), Lonza, Walkersville, MD, EE.UU) suplementado con 0.1% de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF, Lonza), 0.1% ml de hidrocortisona (Lonza), 0.1% de gentamicina-anfotericina-B (GA-1000, Lonza), 0.4% de extracto de cerebro bovino (BBE, Lonza), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml Estreptomina y 250 pg/ml de fungizona (BioWhittaker / MA Bioproducts, Walkersville, Maryland, EE.UU.)

Para los experimentos *in vitro*, las células HUVEC se cultivaron en placas de 6 pocillos (4x10⁵ células por pocillo) en 1,5 ml de medio completo. Después de 24 horas las células se pretrataron durante 15 min con la solución bloqueante FCRII (Miltenyi Biotec), y posteriormente se incubaron con IL - 6 (10 ng/ml) durante 9 horas. A continuación se incubaron de nuevo en presencia o en ausencia de tocilizumab (20 µg/ml) durante otras 9 horas.

Finalmente las células cultivadas se recogieron y se procesaron para los estudios posteriores de western blot y RT-PCR.

CO-CULTIVOS DE MONOCITOS AR-HUVEC

Las células HUVECs se cultivaron como se describe anteriormente. Los monocitos aislados de 5 pacientes con AR (sin tratamiento con tocilizumab) se pre-trataron con solución bloqueante FCRII durante 15 min. A continuación, los monocitos se lavaron con 2 ml de PBS, se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos y se sembraron en un soporte permeable (Incorporated Transwell[®] Permeable Supports, Sigma Aldrich, Misuri, EE.UU.) (1 × 10⁶ células por transwell) en medio EBM (*Endothelial Cell Basal*), y se añadieron en los pocillos de la placa presembrados con HUVECs. Así, las HUVECs y los monocitos compartieron el mismo medio de cultivo pero físicamente separados.

Los co-cultivos fueron incubados con IL-6 (10 ng/ml) sola o combinada con tocilizumab (20 µg/ml) como se describe previamente. Las células co-cultivadas (monocitos de AR y HUVEC) se recogieron por separado para el aislamiento de ARN total y posterior realización de RT-PCR.

AISLAMIENTO DE ARN

La extracción de ARN total de las células (monocitos, neutrófilos y células endoteliales) se llevó a cabo mediante el reactivo TRIsure™ (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Específicamente, en una primera fase se realizó la lisis celular con TRIsure™ tras lo cual se aisló el ARN mediante cloroformo. A continuación, se procedió a su precipitación con isopropanol y a su posterior lavado con etanol al 70%. Para solubilizar el ARN se añadió H₂O libre de ARNasas y se incubó en un termobloque a 56°C, 5 min. Por último, se cuantificó la cantidad y pureza de ARN extraída en un DeNovix DS-11 Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, Delaware, Estados Unidos). El ratio OD260/OD280 estuvo entre 1.8 y 2.

RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

A continuación, el ARN total se trató con DNasa (proporción 1/10) (NZYTech, Lisboa, Portugal) durante 10 min a 37°C para la eliminación de la posible contaminación con ADN producida durante el proceso de extracción, tras lo cual se procedió a la síntesis de ADNc. Para ello, 500 µg de ARN total fue retrotranscrito con el kit comercial NZY *First-Strand Synthesis* (NZYTech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una mezcla con 10 µl de Master Mix, 2 µl de enzima retrotranscriptasa, 500 µg de ARN y agua libre de ARNasas hasta obtener un volumen final de 20 µl. La mezcla se sometió a diversas incubaciones a diferentes temperaturas. La primera 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de 30 minutos a 50°C, a continuación 5 minutos a 85 °C. Tras este paso se añadió 1 ml de ARNasa para finalizar con una incubación a 37 °C durante 20 minutos.

La expresión génica se evaluó mediante PCR en tiempo real usando un termociclador LightCycler Sistema Thermal Cycler (Roche Diagnostics, Indianápolis, Indiana, EE.UU.). La reacción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante, en un volumen final de 12 µl. Las reacciones consistieron en una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min de elongación y extensión a 60°C. Se obtuvo un ciclo umbral (valor de Ct, *threshold cycle*) para cada curva de

amplificación y posteriormente se calculó el valor de ΔCt de cada gen restándole el valor de Ct del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa a cada muestra. Los datos de expresión se expresaron como $2^{-\Delta Ct}$. Las muestras se analizaron por triplicado y los controles negativos se incluyeron en todas las reacciones. La reproducibilidad de los ensayos para todos los transcriptos fue inferior al 0,5% en inter-experimentos de prueba e incluso menor en experimentos intra-prueba. Se evaluó la expresión de los genes relacionados con la inflamación: (factor tisular (TF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IL-8, factor de necrosis tumoral alpha ($TNF\alpha$), IL-1 β e IL-6, receptor tipo toll 2 (TLR-2), TLR-4, diglicerido aciltransferasa (DGAT), adipofilina o ADRP (PLIN2)), con la señalización de insulina: sustrato receptor insulina 1 (IRS1) e IRS2 y con la adhesión celular: molécula de adhesión intracelular (ICAM), molécula de adhesión vascular (VCAM) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MONOCITOS Y NEUTRÓFILOS

Se analizaron marcadores de estrés oxidativo en monocitos y neutrófilos mediante citometría de flujo utilizando un láser dual FACSCalibur (Becton Dickinson). El análisis de adquisición de los datos se realizó utilizando el software CELL Quest (Becton Dickinson). Para la evaluación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo anión superóxido y peróxido de hidrógeno, las células fueron incubadas con 20,5 μM DCFH-DA (Sigma-Aldrich) a 37 ° C durante 30 min en la oscuridad o 5 μM dihidroRodamina 123 a 37°C durante 30 min (Sigma - Aldrich). Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS y luego se analizaron en un FACSCalibur de doble láser. Como control interno se utilizó la autofluorescencia de las células sin marcar. Para corroborar el aumento de estrés oxidativo en los pacientes con AR sin tratamiento con tocilizumab se utilizaron monocitos y neutrófilos aislados de donantes sanos.

ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE NETOSIS EN NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON AR

Para evaluar el efecto in vivo del tocilizumab en la generación de NETosis, los neutrófilos de pacientes con AR antes y después de 6 meses de tratamiento con tocilizumab se aislaron y sembraron en placas de 24 pocillos de poli-L-lisina recubierta con cubreobjetos de vidrio (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) y se dejaron sedimentar durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, las células se trataron

con o sin forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, el agente más potente para inducir NET Formación) (600 nM) (Sigma - Aldrich) durante 2 horas.

Para analizar el efecto in vitro del tocilizumab sobre la producción de NETS, se obtuvieron neutrófilos purificados de 5 Pacientes con AR activos (DAS28 moderado-alto) sin tratamiento biológico y se trataron in vitro con solución bloqueante FCRII (Miltenyi Biotec) durante 15 minutos. Posteriormente las células se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. A continuación se sembraron de la misma manera que se describió anteriormente y se pre-trataron con o sin tocilizumab (20 mg/ml) durante 30 minutos, después se incubaron con IL-6 (100 ng/ml) durante 15 horas más o con PMA (600 nM) durante otras 2 horas.

Después de los diferentes tratamientos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se lavaron tres veces con PBS. Se utilizó el marcador Sytox que se une específicamente al ADN. Las células fueron incubadas con Sytox 5 mM (Life Países Bajos) y se visualizaron las NET utilizando un Nikon Eclipse-Ti-S Microscopio de fluorescencia, (software de imágenes NIS-Elements). Se seleccionaron cinco imágenes aleatoriamente de diferentes regiones de cada portaobjetos con un objetivo de 20x. Las NETs se identificaron manualmente en imágenes digitalizadas como estructuras positivas que emanan de células con longitud total mayor a 2x el diámetro de las células no tratadas^{137,138} y se tuvieron en cuenta al menos 3 campos utilizando software IMAGE-J (NIH, Bethesda, MD). Los resultados se expresaron como porcentaje de NETs (formación de NETs).

DETECCIÓN DE NUCLEOSOMAS LIBRE DE CÉLULAS

Los nucleosomas en suero de pacientes con AR se analizaron mediante el kit comercial de *Human Cell Death Detection* ELISAPLUS (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos monoclonales contra el ADN (doble y única hebra) e histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) se utilizaron para detectar mono- y oligonucleosomas en suero de pacientes con AR. La cuantificación de nucleosomas se realizó por determinación fotométrica de la absorbancia a 405 nm, utilizando como longitud de onda de referencia 492 nm.

IDENTIFICACIÓN DE GRANULOCITOS DE BAJA DENSIDAD (LOW DENSITY GRANULOCYTES: LDGs)

Las células mononucleares aisladas de sangre periférica (PMBCs) (5×10^5) de pacientes con AR se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos anti- CD14 humano conjugado con ficoeritrina (PE) y anti-CD15 humano conjugado con ficocianina (FITC) (Biolegend) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Los isotipos de IgGs de PE y FITC de la misma empresa se utilizaron como controles negativos. Las células se lavaron, se resuspendieron en 500 µl de PBS y se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur. La cantidad de LDGs fue expresada como porcentaje de células que presentaban niveles bajos de CD14 y elevados de CD15.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ELASTASA (NE) Y MIELOPEROXIDASA (MPO) EN NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON AR.

100 ml de sangre periférica se incubó con 1 ml de tampón de lisis (BD Pharm Lyse Lysing Buffer) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de la centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos a 4 °C, las células se fijaron y se permeabilizaron con 250 µl de tampón (Kit de solución de fijación / permeabilización BDCytofix / Cytoperm™ con BD GolgiPlug™) durante 20 minutos a 4°C. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-MPO humano conjugado con FITC (BD Biosciences) o con el anticuerpo primario anti-elastasa humana (RbmAb a Neutrophil Elastasa (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente para la detección de la expresión proteica de elastasa en neutrófilos se añadió un anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor (Abcam) durante 30 minutos a 4°C. Se utilizaron isotipos de IgGs como controles negativos. Las células fueron lavadas y adquiridas en el citómetro de flujo FACSCalibur.

AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS Y ARRAY DE PROTEÍNAS INTRACELULARES PATHSCAN

Las proteínas totales de monocitos de pacientes con AR se aislaron utilizando el kit comercial RNA/DNA/Protein Purification Plus kit (Norgen, Biotek corp., Canada, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10 µg de proteínas en un volumen de 75 µl se sometieron al análisis mediante el array de proteínas intracelulares pathScan siguiendo las recomendaciones del fabricante (Cell signaling technologies, Massachusetts, EE.UU.) Se analizaron los niveles de fosforilación de: (ERK1 / 2, STAT1, STAT3, AKT, AMPKa, S6, proteína ribosomal, mTOR,

HSP27, Bad, P70 S6 quinasa, PRAS40, p53, p38, SAPK / JNK, PARP, caspasa-3 y GSK-3b) en monocitos aislados de pacientes con AR, antes y después de 6 meses de tratamiento con tocilizumab.

DETERMINACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PLASMA DE PACIENTES CON AR

Los niveles en plasma de E-selectina y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) se analizaron en el plasma de pacientes con AR antes y después de tratamiento con tocilizumab mediante el inmunoensayo Procarta Plex multiplex (Affymetrix Bioscience, Viena, Austria), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit, permite cuantificar múltiples biomarcadores en una única muestra de plasma mediante diversos anticuerpos unidos a bolas magnéticas que reconocen las proteínas de interés. Las muestras se adquirieron en un sistema Bio-Plex 200 (BioRad Laboratories) y se analizaron con el software Bio-Plex Manager (BioRad Laboratories)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron en forma de media \pm DESVEST para las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y porcentajes para las cualitativas. Siguiendo el test de la normalidad e igualdad de varianza, las comparaciones fueron hechas a través de test paramétricos (Test "t" de Student para datos apareados) o alternativamente usando test no paramétricos (Test "U" de Mann-Whitney). Todos los contrastes fueron bilaterales y se consideraron significativos aquellos dónde $p \leq 0.05$. El análisis estadístico fue realizado usando el programa estadístico SPSS versión 17.0 de Windows (SPSS Iberica, Madrid, España).

RESULTADOS

RESULTADOS

TCZ MEJORÓ LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD, LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y LA DE EN PACIENTES CON AR.

El tratamiento con TCZ (162 mg/ml semanal) durante 6 meses redujo significativamente el número de articulaciones inflamadas y dolorosas en los pacientes AR. Tras el tratamiento también hubo una mejoría de la actividad de la enfermedad mostrada por una disminución de los niveles medios de EVA y de DAS28, que disminuyó de alta actividad a una actividad moderada-baja: El DAS 28 experimentó un descenso medio de 1,35 (+/- DESVEST) (+/- 0,78). Asimismo, se produjo una modulación de la autoinmunidad tras el tratamiento in vivo con TCZ, mostrada por una reducción de los niveles de FR. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de ACPA. En cuanto a los reactantes de fase aguda se produjo una disminución significativa de los niveles de VSG y PCR después del tratamiento.

TCZ también moduló el perfil lipídico en el plasma, aumentando los niveles de colesterol HDL y la ApoA1 (Tabla I).

Tabla 1. Características clínicas y analíticas basales y después del tratamiento con TCZ de los pacientes con AR incluidos en el estudio.

Parámetros clínicos	Basal	TCZ	Valor de p
Hombres /Mujeres (n/n)	16/4		
Edad (años)	47.80± 2.30		
Duración de la enfermedad (años)	7.60± 1.76		
Niveles de FR	90.84± 25.22	54.22±13.99	p=0.041
Niveles de ACPA	761.09± 240.19	762.54±251.44	p=0.991
Obesidad (%)	6.10		
Diabetes (%)	1		
Hipertensión (%)	2		
Menopausia (%)	50		
Fumadores (%)	25		
Daño articular			
Articulaciones inflamadas (n)	6.14± 1.01	0.71± 0.47	p=0.001
Articulaciones dolorosas (n)	19.00± 4.58	8.00±2.93	p=0.045
DAS28	4.25± 0.18	2.90±0.42	p=0.021
EVA	71.5± 3.94	48.33±3.34	p=0.001
HAQ	1.54± 0.31	1.04±0.33	p=0.046
Perfil lipídico			
Colesterol Total (mg /dl)	180.00 ± 9.33	201.20±7.39	p=0.070
HDL Colesterol (mg/dl)	45.6± 2.51	56.10±2.42	p=0.001
LDL Colesterol (mg/dl)	115.30± 8.83	124.30±9.30	p=0.319
Triglicéridos (mg/dl)	94.00± 8.70	102.6±9.57	p=0.273
Apolipoproteína A1	130.80 ± 5.68	151.90±7.31	p=0.042
Apolipoproteína B	73.60± 4.44	79.90±6.14	p=0.264
Cociente ApoB/APoA1	0.57± 0.051	0.52±0.035	p=0.267
Parámetros inflamatorios			
VSG (mm/h)	25.40± 6.09	4.22±0.70	p=0.014
PCR (mg/dl)	13.29± 6.08	0.46±0.18	p=0.045
Tratamientos			
Corticoides (%)	62.5	62.5	
Hidroxicloroquina (%)	12.5	12.5	
AINES (%)	75	75	
Metotrexato (%)	63.5	63.5	
Leflunomida (%)	30	30	
Vitamina D (%)	18	18	

□

Los valores representan la media ± Desviación Estándar (DESVEST). HDL= Lipoproteína de alta densidad; LDL= Lipoproteína de baja densidad; DAS28=Tasa de actividad de la enfermedad; ACPA = anticuerpos anti-peptidos cíclicos citrulinados; VSG= Velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C reactiva; AINES= Antiinflamatorios no esteroideos; FR= Factor Reumatoide

La función endotelial (valorada a través de la medición de la hiperemia post-
 isquémica reactiva por láser Doppler) mejoró significativamente tras el tratamiento
 con TCZ, mostrado mediante el aumento del valor del pico de flujo sanguíneo después
 de la oclusión (Flujo máximo, PF) y el aumento del área hiperémica (AH) (Fig. 1, A).

De forma paralela analizamos los cambios producidos en los niveles plasmáticos de
 moléculas de adhesión celular, las cuales están estrechamente relacionadas con la DE.
 Así, los niveles de E-selectina y VCAM-1 se encontraron significativamente más bajos
 tras tratamiento con TCZ. Estos resultados apoyan la mejora de la función vascular en
 los pacientes AR tratados con TCZ (Fig 1, B).

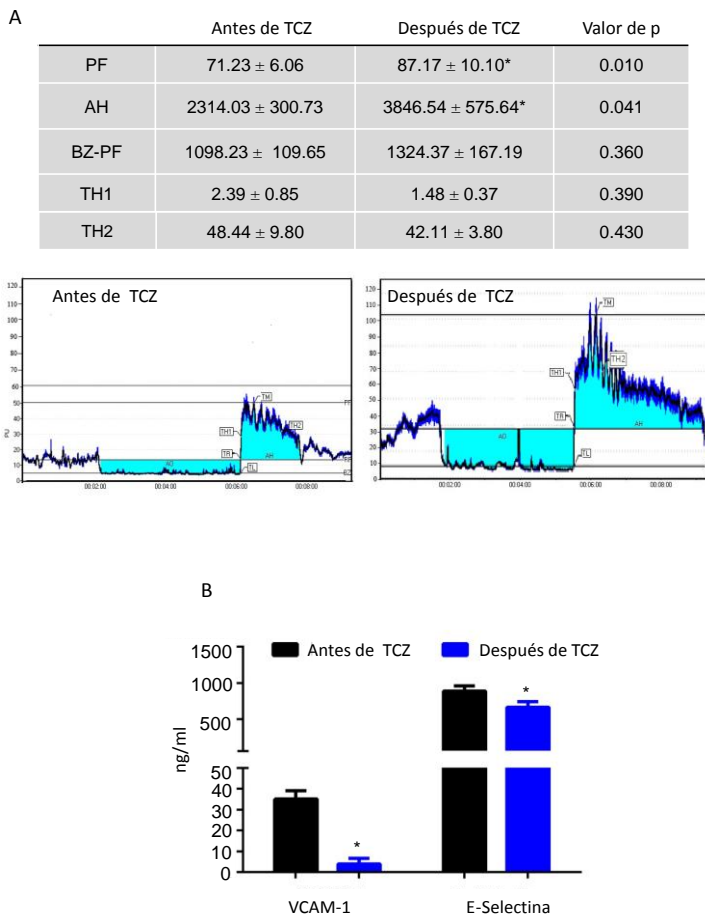


Figura 1. Mejora de la función endotelial en pacientes AR tratados con TCZ. (A) Análisis de la función microvascular utilizando un láser doppler lineal PeriFlux 5010 a tiempo basal y después de 6 meses de tratamiento con TCZ. (B) Análisis de los niveles de E-selectina y de VCAM-1 procedentes de plasma de AR, antes y después del tratamiento con TCZ mediante el inmunoensayo Procarta Plex Multiplex. Se muestran los datos como media +/- DESVEST, n= 20 pacientes. (*) Indica diferencias significativas respecto a antes de tratamiento con TCZ (p< 0,05).

TCZ REDUJO EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS LEUCOCITOS DE LOS PACIENTES CON AR. Recientemente se ha demostrado un aumento del estrés oxidativo en los leucocitos de pacientes con AR, directamente relacionado con los títulos de ACPAs, así como con la expresión de una serie de parámetros inflamatorios que contribuyen a la aterosclerosis (⁷⁹). Por consiguiente, los niveles de peróxidos y peroxinitritos fueron reducidos en monocitos y neutrófilos de pacientes AR tras tratamiento in vivo con TCZ, mostrado por una reducción significativa de la media de intensidad de fluorescencia de DHRH y DCFHDA mediante citometría de flujo (Fig. 2, A y B).

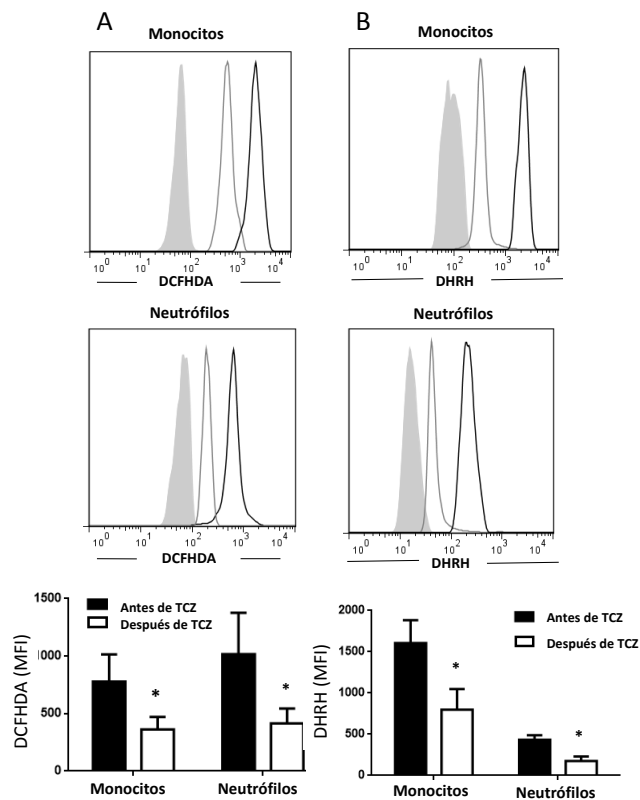


Figura 2. Análisis del estrés oxidativo en los monocitos y neutrófilos de pacientes AR tras tratamiento con TCZ (A) La producción de peróxidos en monocitos y neutrófilos de pacientes con AR a tiempo basal y después de 6 meses de tratamiento con (TCZ) se determinó utilizando la sonda fluorescente DCFHDA mediante citometría de flujo. (B) La producción de peróxidos y peroxinitritos en monocitos y neutrófilos de pacientes con AR antes y después del tratamiento con TCZ se determinó utilizando la sonda fluorescente DHRH-123 mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las sondas DCFHDA y DHRH en un donante sano (histograma completo), un paciente con AR antes del tratamiento con TCZ (histograma negro), y el mismo paciente después del tratamiento con TCZ (histograma gris). Los gráficos de barras muestran la media +/- DESVEST de la IMF. (n=20 pacientes). (*) Indica diferencias significativas respecto a antes de tratamiento con TCZ (p< 0,05).

EL TRATAMIENTO CON TCZ EN PACIENTES CON AR REDUJO EL PORCENTAJE DE GRANULOCITOS DE BAJA DENSIDAD Y LA GENERACIÓN DE NETOSIS.

Recientemente, se ha identificado un nuevo subtipo de neutrófilos llamados granulocitos de baja densidad (LDGs, del inglés *low density granulocytes*) en sangre periférica de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes. Estas células se caracterizan por tener un tamaño y complejidad similar a la de las células mononucleares y mostrar un perfil fenotípico basado en bajos niveles de expresión de CD14 y elevados niveles CD15 en su membrana. Se ha descrito que los LDGs presentan un perfil más inflamatorio y son más propensos a producir NETosis que los neutrófilos normales⁴⁷. En el presente estudio, se observó una reducción significativa en el porcentaje de LDGs en sangre periférica de pacientes con AR tratados con TCZ durante 6 meses (Fig. 3, A).

Estudios previos han demostrado que los pacientes con AR presentan un aumento de la generación espontánea de NETs, con mayor expresión de EN y MPO. En nuestro estudio, EN y MPO (principales enzimas que lideran el inicio de la NETosis) se encontraron reducidas en los neutrófilos de pacientes con AR tratados con TCZ (Fig. 3, B). Además, los neutrófilos de pacientes con AR tratados con TCZ durante 6 meses mostraron una reducción en la generación de NETs, de manera que el área de fibras de ADN teñidas con SYTOX se redujo significativamente por el efecto de TCZ en los neutrófilos de AR tratados con PMA (del inglés *phorpol-12-myristate-13-acetate*) para inducir NETosis (Fig. 3, D). Apoyando la reducción de la producción de NETosis por TCZ observada a nivel celular, se detectó una disminución de los niveles de nucleosomas en el suero de pacientes con AR después de este tratamiento (Fig. 3, C).

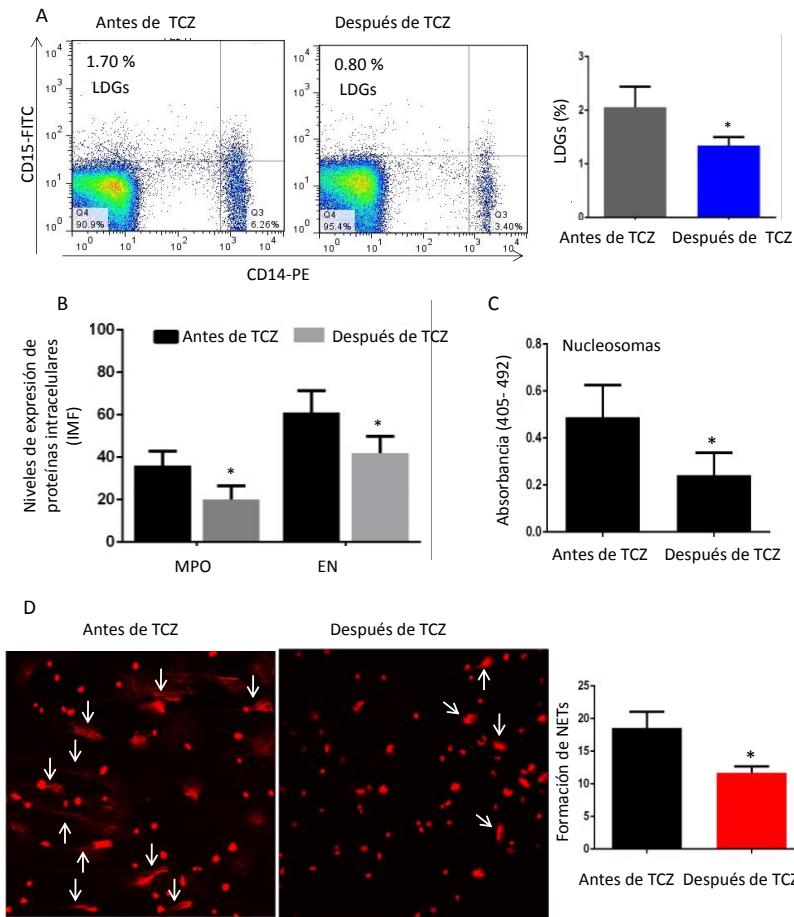


Figura 3. Reducción del porcentaje de LDGs y la generación de NETosis tras tratamiento con TCZ en pacientes AR. (A) Dot plots representando los granulocitos de baja densidad (LDGs) de pacientes con AR antes y después del tratamiento con TCZ. (B) Niveles de la expresión de proteínas intracelulares (EN y MPO) en neutrófilos de pacientes con AR a tiempo basal y después de 6 meses de tratamiento con TCZ mediante citometría de flujo. Los gráficos de barras muestran la media \pm DESVEST de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de estas proteínas. (C) Niveles de nucleosomas libres de células (*cell free nucleosomes*) en suero, medidos por ELISA. (D) Imágenes representativas de NETs de pacientes con AR antes y después de tratamiento con TCZ. La NETosis fue inducida por phorbol-12-myristate-13-acetato (PMA) (600 nM) durante 2 horas. El ADN se tiñó con colorante naranja SYTOX y las NETs se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti-S con un objetivo de 203. Se tomaron cinco imágenes seleccionadas al azar de diferentes regiones de cada porta-objetos por cada caso. Las NETs fueron identificadas manualmente en las imágenes digitalizadas como estructuras positivas teñidas con SYTOX que emanan de las células con un área total superior a 2 veces el área de las células sin PMA. Las puntas de flecha muestran las NETs. La formación de NETs representa el porcentaje promedio de estructuras NETs de las 5 imágenes tomadas en cada condición. Los gráficos de barras muestran la media \pm DESVEST (n= 20 pacientes). (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a antes del tratamiento con TCZ.

EL TRATAMIENTO IN VIVO CON TCZ REDUJO EL PERFIL PROCOAGULANTE E INFLAMATORIO Y MODULÓ LA SEÑAL DE LA INSULINA EN LOS MONOCITOS DE PACIENTES AR.

La expresión génica de moléculas involucradas en la inflamación (MCP-1, TLR4 y TLR2), la actividad procoagulante (TF) y la migración (IL-8) se redujo en los monocitos de pacientes AR tratados con TCZ (Fig. 4, A). Sin embargo, la inhibición in vivo de la señalización del IL-6R por TCZ aumentó la expresión génica de IL-6 en los monocitos de los pacientes con AR. La expresión de genes relacionados con la señal de insulina, como el IRS-1 y el IRS-2, también se encontró elevada en los monocitos de pacientes con AR tratados con TCZ en comparación con el estado basal. Por otro lado, la expresión génica de moléculas implicadas en el metabolismo lipídico (DGAT y PLIN2) se redujo significativamente en monocitos de pacientes con AR después de 6 meses de tratamiento con TCZ (Fig. 4).

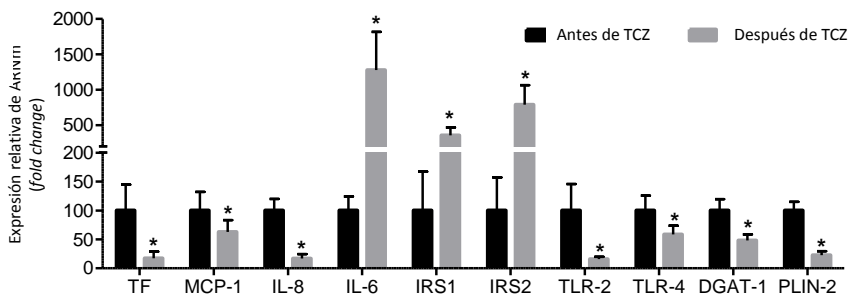
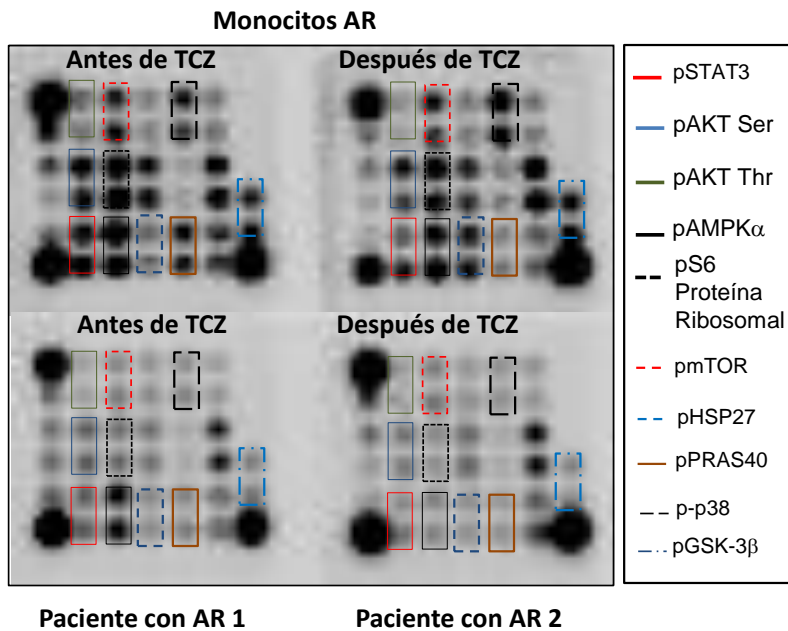


Figura 4. TCZ modula la expresión génica de moléculas proinflamatorias, procoagulantes y señal de la insulina en monocitos de pacientes AR. El gráfico de barras muestra los niveles de expresión del ARNm de genes relacionados con la inflamación (MCP-1, IL-8, IL-6, TLR2 y TLR4), la actividad procoagulante (TF), el metabolismo lipídico (DGAT-1 y PLIN2), y la señal de la insulina (IRS-1 e IRS-2) en monocitos de pacientes con AR antes y después del tratamiento durante 6 meses con TCZ.

TCZ MODIFICÓ LA ACTIVACIÓN DE DIVERSAS RUTAS INTRACELULARES EN MONOCITOS DE PACIENTES CON AR.

Se ha descrito que la alteración de las vías de señalización intracelular desempeña un papel importante en la AR, mediando la inflamación crónica presente en estos pacientes¹³⁹. Utilizando un array de proteínas, analizamos los cambios promovidos por el tratamiento con TCZ en la activación de 18 quinasas intracelulares en monocitos de pacientes con AR. Como se esperaba, la inhibición de la señalización del IL-6R por TCZ redujo significativamente la fosforilación de STAT3, una quinasa activada directamente por la unión de IL-6 a su receptor. Así mismo, la fosforilación de otras 7 proteínas quinasas se encontró significativamente reducida por TCZ en monocitos de AR, incluyendo AKT, AMPKa, S6 Proteína ribosomal, p38, HSP27, PRAS40 y GSK3-b (Fig. 5, A y B).

5A



5B

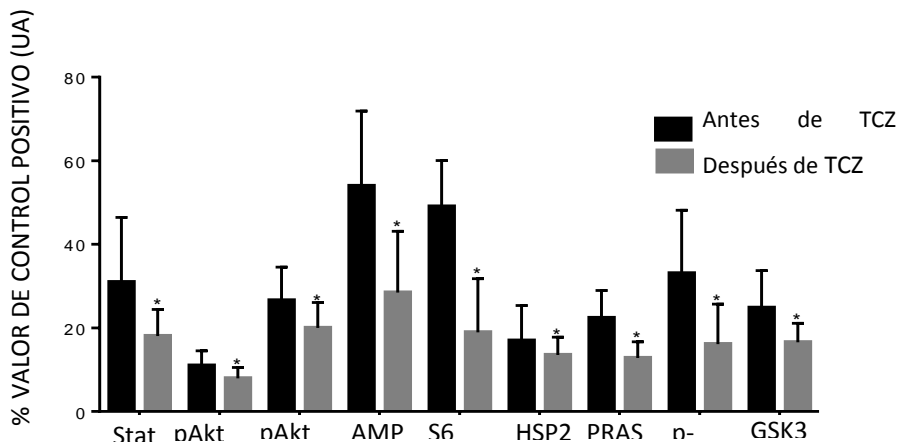


Figura 5. Efecto del TCZ sobre la activación de diversas vías intracelulares en monocitos de pacientes AR. (A) Dos paneles representativos del estado de fosforilación de quinasas utilizando un array de señalización intracelular PathScan en monocitos de AR. (B) Cuantificación de la intensidad de volumen x área (mm²). Los datos se presentan como media +/- DESVEST (n =20 pacientes). (*) Indica diferencias significativas respecto a antes del inicio de TCZ (P< 0,05).

EL TRATAMIENTO IN VITRO CON TCZ DE LOS NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS PURIFICADOS DE PACIENTES CON AR REDUCE LA GENERACIÓN DE NETOSIS Y MEJORA EL PERFIL INFLAMATORIO Y TROMBÓTICO DE LOS MONOCITOS

Para evaluar la especificidad del efecto del TCZ, se realizaron estudios in vitro en monocitos y neutrófilos purificados de pacientes AR que no estaban tratados con TCZ. En neutrófilos, el pretratamiento con IL-6 durante 6 horas promovió un aumento significativo en los niveles de expresión proteica de EN y MPO, los cuales fueron reducidos tras tratamiento con TCZ (Fig. 6, A y B). Además, el tratamiento in vitro de los neutrófilos de pacientes con AR con IL-6 o PMA promovió un aumento en la generación de NETosis. La combinación de TCZ más IL-6 o PMA redujo de forma significativa la extrusión de las fibras de ADN de neutrófilos en comparación con el tratamiento con IL-6 y PMA solos, lo que sugiere que TCZ podría prevenir la generación de NETosis en pacientes con AR (Fig. 6, C).

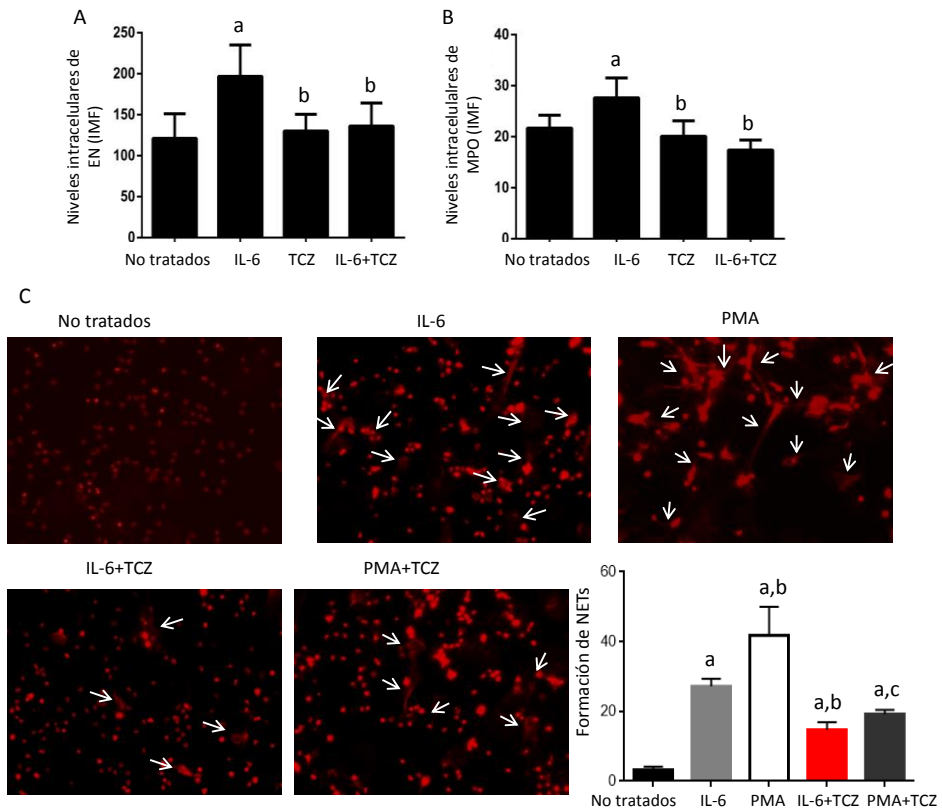


Figura 6. Efecto del tratamiento in vitro de neutrófilos de pacientes AR con TCZ en la generación de NETosis. (A y B) La expresión proteica de EN y MPO se analizó mediante citometría de flujo en neutrófilos aislados de 5 pacientes con AR y tratados con IL-6 (10 ng/ml), TCZ (20 mg/ml) y la combinación de ambos. Los gráficos de barras muestran la media +/- DESVEST de la IMF de 5 experimentos independientes. (a) Indica diferencias significativas respecto a los no tratados y (b) respecto a los tratados con IL-6 ($p < 0,05$). (C) Estas imágenes representan las NETs de neutrófilos aislados de 5 pacientes con AR a tiempo basal (sin tomar TCZ) y tratados con IL-6 (100 ng / ml), TCZ (20 mg/ml), o la combinación de ambos durante 15 horas. También se trató con PMA (600 nM) sólo o combinado con TCZ (20 mg / ml) durante 2 horas. El ADN se tiñó con SYTOX y se visualizaron las NETs usando un objetivo de microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti-S 203. Se seleccionaron 5 imágenes aleatoriamente de diferentes regiones de cada porta-objetos por caso. Las NETs fueron identificadas manualmente en las imágenes digitalizadas como estructuras positivas teñidas con SYTOX que emanan de las células con un área total superior a 2 veces el área de las células no tratadas. Las puntas de flecha muestran las estructuras NETs. La formación de NETs representa el porcentaje promedio de estructuras NETs de las 5 imágenes tomadas en cada condición. Los gráficos de barras muestran la media +/- DESVEST del porcentaje de NETs de 5 experimentos independientes, $n = 5$ pacientes diferentes. (a) Indica diferencias respecto a no tratados (b) respecto a tratados con IL-6 (c) respecto a tratados con PMA ($p < 0,05$).

Por otro lado, el tratamiento in vitro con TCZ de monocitos aislados de pacientes con AR redujo su perfil inflamatorio y protrombótico, lo cual se puso de manifiesto por la disminución de la elevada expresión de TLR2, TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, VEGF, VCAM, y ICAM observados en los monocitos no tratados o inducida por IL-6 (Fig. 7)

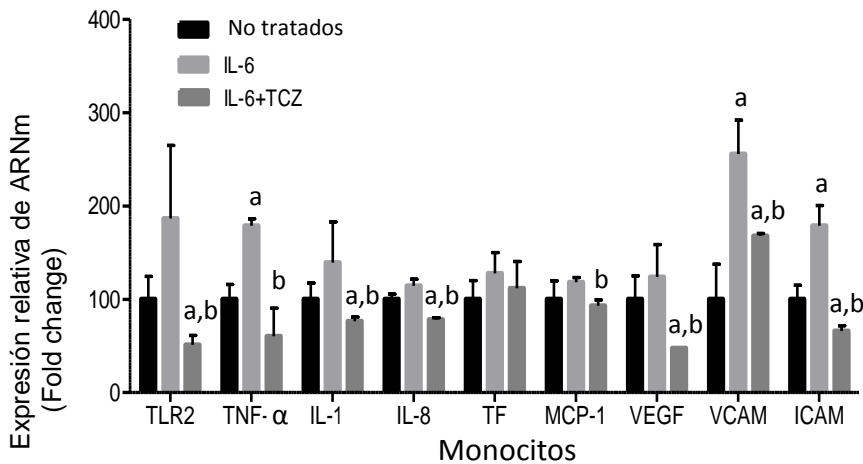


Figura 7. Efecto del tratamiento in vitro con TCZ en el perfil inflamatorio y pro-trombótico de monocitos de pacientes AR. Niveles de expresión de ARNm en monocitos purificados de 5 pacientes con AR en estado basal (no tratados y tratados con IL-6 (10 ng / ml), TCZ (20 mg/ml) o IL-6 más TCZ durante 18 horas). Los gráficos de barras muestran la media +/- DESVEST de 5 experimentos independientes, (n =5) (a) Indica diferencias significativas respecto a monocitos no tratados; (b) frente a monocitos tratados con IL-6; (p< 0,05).

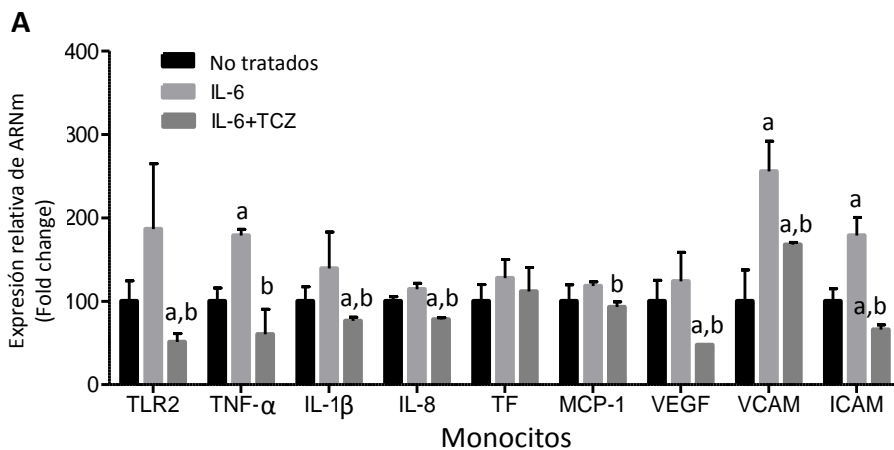
TCZ REDUJO SIGNIFICATIVAMENTE LA ELEVADA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MEDIADORES INFLAMATORIOS INDUCIDA POR IL-6 EN CÉLULAS ENDOTELIALES SOLAS O COCULTIVADAS CON MONOCITOS PURIFICADOS DE PACIENTES CON AR.

Para imitar los efectos in vivo del TCZ en la pared de los vasos sanguíneos, se realizaron tratamientos in vitro de las células HUVEC con IL-6 sólo o en combinación con TCZ.

Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm de TLR2, IL-8, MCP-1, VEGF y VCAM en las células HUVECs después del tratamiento con IL-6 durante 18 horas. Esos niveles elevados fueron disminuidos tras tratamiento con TCZ,

lo que sugiere que el bloqueo del IL-6R puede tener un efecto beneficioso sobre la función endotelial (Figura 8, A).

Por otro lado, se analizó la interacción entre las células endoteliales y los monocitos en el contexto de la AR realizando cocultivos de monocitos aislados de pacientes AR con células endoteliales HUVEC. Así, el cocultivo de monocitos de AR con HUVECs aumentó los niveles de expresión de ARNm de TLR2, TNF- α , IL-1 β , IL-8, TF, MCP-1, ICAM, VCAM y VEGF en células endoteliales. Además, estos genes aumentaron significativamente después de la adición de IL-6 al medio de cocultivo (HUVECs con monocitos de AR). Una vez más, TCZ redujo la expresión inducida por IL-6 tanto de las moléculas de adhesión como de los mediadores inflamatorios y protrombóticos en las células endoteliales cocultivadas con monocitos purificados de AR (Fig. 8, B), lo cual remarca el papel tan relevante de este inhibidor del IL-6R tanto en la mejora de la función endotelial, como en la disminución del perfil proinflamatorio mediado por monocitos asociado a ese trastorno autoinmune.



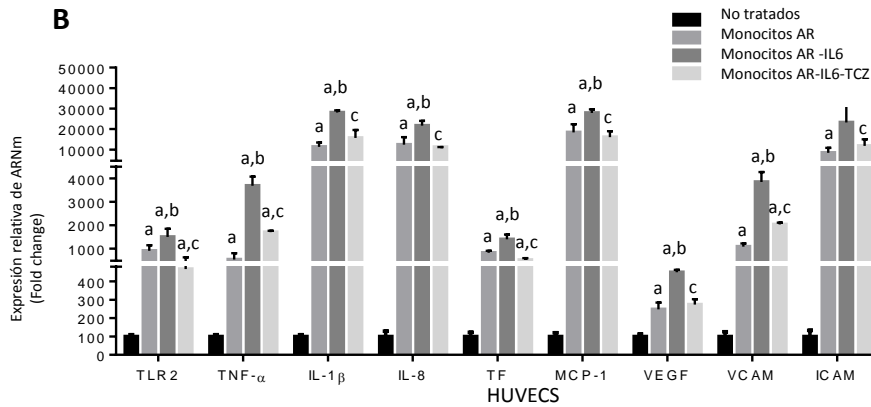


Figura 8. Efecto del tratamiento in vitro con TCZ en células endoteliales solas o en cocultivo con monocitos de pacientes AR. (A) Niveles de expresión de ARNm en células HUVEC tratadas con IL-6 (10 ng / ml) sólo o en combinación con TCZ (20 mg / ml). Los gráficos de barras muestran la media +/- DEVEST de 3 experimentos independientes. (a) Indica diferencias significativas respecto a no tratados (b) respecto a tratados con IL-6 ($p < 0,05$). (C) Niveles de expresión de ARNm en células HUVEC solas o cocultivadas con monocitos de AR y tratados con o sin IL-6 (10 ng / ml) sola o en combinación con TCZ (20 mg / ml). Los gráficos de barras muestran la media +/- DESVEST de 3 experimentos independientes. (a) Indica diferencias significativas respecto a células HUVEC cultivadas solas y no tratadas; (b) respecto a cocultivo con monocitos de AR (c) respecto al cocultivo con monocitos de AR tratados con IL-6 ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio describe por primera vez cómo el tratamiento con TCZ podría mejorar el perfil proaterotrombótico en pacientes con AR, explorando los cambios moleculares relacionados con la inflamación, las propiedades procoagulantes y las vías de señalización intracelular en los monocitos de AR, así como la prevención de la generación de NETosis por parte de los neutrófilos y la mejora de la DE.

Datos publicados recientemente han demostrado que la combinación de tratamiento con FAMEs (Fármacos modificadores de la enfermedad) biológicos y sintéticos, representa la mejor opción de tratamiento de la AR, ya que puede enlentecer la progresión del daño estructural¹⁴⁰. En nuestra cohorte de pacientes, la combinación de TCZ con FAMEs sintéticos (metotrexato, leflunomida e hidroxicloroquina), mejoró globalmente la actividad de la enfermedad, con una remisión del DAS28 evidenciada por: una disminución en el número de articulaciones dolorosas e inflamadas, de los parámetros inflamatorios analíticos y de la evaluación global del dolor por parte del paciente.

En cuanto a la autoinmunidad, el tratamiento con TCZ durante seis meses también redujo de forma significativa los niveles de FR. Sin embargo, no se observó ningún cambio en los niveles de ACPAs. En este sentido, un trabajo reciente de Iannone y colaboradores¹⁴⁰ evaluó el efecto de varios FAMEs biológicos sobre los niveles de FR y ACPAs en pacientes con AR y demostró que tras 12 meses de tratamiento con TCZ se redujeron significativamente tanto los niveles de FR como los de ACPA. Por tanto, podría ser necesario un tratamiento más prolongado con TCZ para reducir los niveles de ACPA.

Recientemente varios estudios han evaluado los cambios en el perfil lipídico asociados con el riesgo cardiovascular en pacientes con AR después del tratamiento con TCZ. Así, en ensayos clínicos fase II y III se han descrito alteraciones en los niveles de LDLc, HDLc y triglicéridos debidos al tratamiento con TCZ. De este modo, comparando con pacientes sin terapia biológica o en tratamiento con otros FAMEs biológicos (incluyendo adalimumab, rituximab y tofacitinib), después de 6 meses de tratamiento con TCZ, se incrementaron considerablemente los niveles de HDLc, traducidos en un aumento de los niveles de colesterol total¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Algunos de estos estudios mostraron además un

aumento de LDLc y triglicéridos producido por TCZ. En nuestra cohorte de pacientes se observó un aumento significativo de los niveles de HDLc; sin embargo, los niveles de colesterol total no se modificaron, lo cual puede ser debido a que los niveles de triglicéridos y LDLc permanecieron inalterados tras 6 meses de tratamiento con TCZ. Así mismo, los niveles de ApoA1 (el mayor componente de la HDL) también aumentaron significativamente tras el tratamiento con este fármaco. Así en nuestra cohorte de pacientes con AR, TCZ tuvo un efecto beneficioso en el perfil lipídico, aumentando los niveles de HDL y su principal integrante ApoA1.

Por otro lado, el efecto de TCZ en DE ha sido mínimamente explorado. Protogerou y colaboradores¹¹⁸, estudiaron la dilatación medida por flujo y la rigidez aórtica en 16 pacientes tratados con TCZ durante 3 y 6 meses. Los resultados de este trabajo indicaron que TCZ mejoró la DE, mostrada por una disminución de la velocidad de onda del pulso desde la carótida a la femoral y un aumento de la dilatación medida por flujo¹¹⁸. Además, en un estudio donde comparaban el efecto de TCZ con otros dos FAMEs biológicos en monoterapia, tales como etanercept y adalimumab, se observó que en los 3 casos la rigidez arterial disminuía de forma similar después 6 meses de tratamiento¹⁴⁵. De acuerdo con estos datos, nuestra cohorte de pacientes AR muestra una mejoría significativa de la función microvascular, mostrando un aumento del valor del pico de flujo sanguíneo después de la oclusión y un aumento del área hiperémica. Por tanto, el presente trabajo aporta una nueva evidencia que demuestra la eficacia de TCZ reduciendo la DE en terapia combinada con FAMEs sintéticos convencionales.

De forma paralela, en el plasma de estos pacientes se observó una disminución significativa de los niveles de moléculas de adhesión celular, tales como E-selectina y VCAM-1 tras tratamiento con TCZ. Niveles elevados de estas moléculas han sido asociados con DE. Por tanto, una reducción de los niveles de las mismas sugiere una mejora de la función vascular en los pacientes AR tratados con TCZ combinado con FAMEs convencionales, apoyando los resultados obtenidos mediante el análisis de la función microvascular con el láser doppler. En este sentido, solo un estudio reciente ha mostrado una disminución en los niveles séricos de una molécula igualmente implicada en la DE, como es el VEGF, en pacientes AR tras 6 meses de tratamiento con TCZ en monoterapia¹³¹.

Nuestros estudios in vivo en pacientes AR tratados con TCZ, fueron apoyados con experimentos in vitro, en los que células endoteliales HUVEC fueron tratadas con este fármaco tras ser activadas con IL-6. Así el tratamiento con TCZ, redujo significativamente los niveles de expresión elevados de moléculas de adhesión y activación del endotelio, inducidos por IL-6: TLR2, IL-8, MCP-1, VEGF, ICAM y VCAM. Además, demostramos como los monocitos aislados de pacientes AR con alta actividad de la enfermedad y no tratados con ningún FAME biológico, inducían la expresión de moléculas de adhesión en las HUVECs al ponerlos juntos en cocultivo. Asimismo, la adición de TCZ al cocultivo de monocitos AR con HUVECs, redujo la expresión inducida por IL-6 de los mediadores inflamatorios y protrombóticos y las moléculas de adhesión celular, representado por una reducción en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-8, TF, MCP-1, TLR2, ICAM, VCAM y VEGF.

De acuerdo con nuestros resultados, un estudio realizado por Suzuki y colaboradores ha descrito la importancia de la IL-6 en el aumento de la tasa de migración celular, y el papel de TCZ en la reducción de la adhesión de los monocitos (U937) a las células HUVEC¹⁴⁶. En conjunto, nuestro estudio, realizado in vivo con pacientes AR e in vitro con células endoteliales, apoya la eficacia de TCZ en el restablecimiento de la función endotelial mediante la reducción de moléculas de adhesión y de mediadores inflamatorios y protrombóticos.

Una alteración en el estatus oxidativo se ha relacionado estrechamente con enfermedad CV. En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente un aumento del estrés oxidativo en leucocitos y plasma de pacientes con AR, observándose un incremento de peróxidos y peroxinitritos intracelulares en los monocitos y neutrófilos de estos pacientes en comparación con donantes sanos. En ambas poblaciones celulares se observó además un elevado porcentaje de células con despolarización de la membrana mitocondrial. Por el contrario, se observó una disminución significativa de la capacidad antioxidante total en el plasma de estos pacientes⁷⁹. El presente estudio muestra por primera vez los efectos de la inhibición de la señalización del receptor de la IL-6 en la reducción del estrés oxidativo en monocitos y neutrófilos de pacientes AR. El tratamiento in vivo con TCZ redujo significativamente los niveles de peróxidos y peroxinitritos en ambos tipos celulares. Otros tipos de FAMEs biológicos, como etanercept e infliximab, también han demostrado disminuir el estrés oxidativo en suero y orina

de pacientes con AR ^{147,148}. Comparando con otros tratamientos, solo existe un estudio reciente en el que se ha demostrado que TCZ es más eficiente en la reducción de los niveles séricos de marcadores de estrés oxidativo que los FAMES sintéticos y terapia anti-TNF α ¹⁴⁹. Apoyando este artículo, nuestro estudio muestra la gran eficacia de TCZ en la reducción del estrés oxidativo, no sólo a nivel plasmático, sino también a nivel celular, en los monocitos y neutrófilos AR, lo que podría contribuir a evitar el daño vascular en pacientes con esta enfermedad.

Los monocitos de pacientes con AR exhiben un perfil proaterotrombótico, mostrando una expresión elevada de citoquinas proinflamatorias y factores procoagulantes ⁷⁹. El efecto de TCZ sobre los marcadores aterotrombóticos asociados con la AR a nivel plasmático ya ha sido descrito. Así, se ha observado que el TCZ reduce las moléculas protrombóticas incluyendo el dímero D, el fragmento protrombótico 1+1, el fibrinógeno, la lipoproteína A y la fosfolipasa A2 IIA en el plasma de pacientes con AR ^{142,150,151}. Sin embargo, existe poca evidencia sobre el efecto de TCZ en los monocitos AR; solamente se ha descrito que TCZ induce apoptosis en estas células ¹⁵². En este estudio analizamos en profundidad los cambios moleculares que ocurren en monocitos de pacientes con AR tratados con TCZ, observando una reducción significativa de genes involucrados en el perfil inflamatorio, las propiedades protrombóticas y la capacidad migratoria: TLR2, TNF α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, VEGF, VCAM e ICAM.

Por otro lado, se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de la IL-6 en los monocitos de pacientes con AR que fueron tratados con TCZ durante 6 meses. Nuestros resultados son acordes con los publicados recientemente por Nishimoto y colaboradores. Este grupo describió que los niveles circulantes de IL-6 y de sIL-6R aumentaron después de la administración de TCZ en pacientes con AR ¹⁵³. Argumentaron que este efecto fue debido probablemente a una reducción de su eliminación después de la formación de los inmunocomplejos TCZ/sIL-6R. En esta misma línea, el aumento de los niveles de expresión génica de la IL-6 en nuestro estudio podría deberse a ese proceso de retroalimentación.

Además, en este trabajo presentamos nuevas evidencias sobre el efecto de TCZ en la formación de gotas lipídicas en los monocitos AR. Esta acumulación de gotas lipídicas dentro de los leucocitos en condiciones inflamatorias ya ha sido descrito previamente ¹⁵⁴. Las gotas lipídicas albergan varias proteínas y lípidos involucrados en el control de biosíntesis y la secreción de moléculas inflamatorias,

incluyendo leucotrieno y PGE2. Los genes PLIN y DGAT están implicados en su regulación. La sobreexpresión de PLIN2 produce una mayor formación de gotas lipídicas¹⁵⁵. Por otro lado, el crecimiento de estas formaciones lipídicas está relacionado con funciones realizadas por el retículo endoplásmico mediado por proteínas presentes en el mismo, tales como el DGAT. En el presente estudio se encontró una reducción significativa en la expresión de estos genes en los monocitos AR tratados in vivo con TCZ, lo que podría sugerir que TCZ redujo la formación de gotas lipídicas, a través de la inhibición de la inflamación mediada por las células inmunes. Sin embargo, es necesaria una investigación más profunda para definir el efecto de TCZ en el metabolismo lipídico y en su almacenamiento dentro de estas células.

Estudios previos han demostrado que los pacientes con AR presentan mayor resistencia a la insulina en comparación con controles sanos¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. El estatus inflamatorio propio de estos pacientes induce una alteración sobre la sensibilidad de esta hormona. Dentro de las interleuquinas implicadas, la IL-6 exhibe una estrecha asociación con la resistencia a la insulina¹⁵⁹. En un estudio realizado por Schultz et al.,¹⁶⁰ se analizó el efecto de la inhibición de la de la interleuquina-6 sobre la sensibilidad a la insulina y los niveles de lipoproteína A (LpA) demostrándose que la inhibición de esta interleuquina se relaciona con una mejora de la resistencia a la insulina y con una disminución de LpA, que podría reducir el riesgo cardiovascular en estos pacientes. En esta misma línea, en nuestro trabajo se observó que la expresión de genes relacionados con la señal de insulina, como el IRS-1 y el IRS-2, se encontró elevada en los monocitos de pacientes con AR tratados con este fármaco en comparación con el estado basal. Estos genes desempeñan un papel regulador importante en la cascada de señalización de la insulina. Diversos estudios han demostrado que la delección específica de estos genes se relaciona con un fenotipo de resistencia a la insulina¹⁶¹⁻¹⁶³, por tanto el aumento de expresión de los mismos mediante tratamiento con TCZ en pacientes con AR podría actuar como factor protector en el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

Las respuestas celulares observadas en monocitos, relacionadas con la producción de citoquinas y factores trombóticos, el metabolismo y almacenamiento lipídico y la señal de la insulina, dependen de la activación de vías de señalización específicas. Se ha descrito previamente que algunas proteínas del

tejido sinovial de los pacientes con AR, se encuentran anormalmente fosforiladas por enzimas tirosina quinasas intracelulares, apoyando la importancia de estas enzimas en la patogénesis de la AR ¹⁶⁴. Como hemos comentado anteriormente, en la patogénesis de esta enfermedad se han visto implicadas diversas citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6 entre otras) que son responsables de la alteración de las vías de señalización intracelular mencionadas; esta alteración va a desempeñar un papel crítico tanto en la proliferación celular como en la inflamación propia de la enfermedad ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Las JAKs son un subgrupo de proteínas cruciales en la iniciación de estas vías y están relacionadas con la fosforilación y activación de las STAT, las cuales controlan la expresión de las dianas nucleares en los genes e inducen la transcripción de genes proinflamatorios ¹⁶⁸. Por otro lado, existen 3 grandes subfamilias de MAPK: p38, extracelular signal-regulated kinase (ERK) y c-Jun N-terminal kinase (JNK), que se encuentran activadas en el tejido sinovial de pacientes con AR, demostrando que desempeñan un papel importante en la inflamación y el daño tisular propio de esta enfermedad. Recientemente, se ha puesto de manifiesto la participación de la vía PI-3K/AKT/mTOR en la proliferación de células inmunes y sinoviocitos, la neoangiogénesis, la apoptosis y la alteración de la inmunidad innata en AR ¹⁶⁹. El uso de un array para identificar un amplio espectro de moléculas de señalización celular constituye una valiosa herramienta para definir mejor los mecanismos reguladores modulados a nivel celular por los efectos de fármacos específicos. En este sentido, nuestro trabajo es el primero que describe un descenso en la activación de las principales vías de señalización asociadas con la patogénesis de AR en monocitos tratados con TCZ: JAK/STAT (del inglés Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription), SAPK/MAPK (del inglés stress-activated protein kinase/mitogen-activated protein kinase) y PI3K/AKT/mTOR (del inglés Phosphatidylinositide-3-Kinase/AKT/mammalian Target of Rapamycin).

Los neutrófilos han sido reconocidos recientemente como células esenciales en el desarrollo de la placa aterosclerótica. Además, el papel de los neutrófilos en la patogénesis de la AR ha sido puesto de manifiesto recientemente, ya que éstos son más susceptibles a experimentar NETosis espontánea ⁴⁵. Los efectos de la IL-6 sobre las funciones de los neutrófilos siguen siendo poco conocidos a día de hoy, existiendo evidencia contradictoria a este respecto. Así, se ha descrito que la IL-6

puede retrasar, acelerar o no tener ningún efecto sobre la apoptosis de los neutrófilos¹⁷⁰⁻¹⁷². En nuestro trabajo, se ha mostrado la importancia de la función de la IL-6 en la activación de los neutrófilos, aumentando los niveles de MPO y NE dentro del neutrófilo e induciendo NETosis. Niveles plasmáticos elevados de IL-6 han sido descritos en la AR⁵⁶, por lo que contribuiría a la exacerbación de la NETosis espontánea presente en esta enfermedad. En el presente estudio, hemos demostrado como TCZ regula la función de los neutrófilos mediante una disminución en la generación de NETosis inducida por IL-6 o por PMA, decisivo en el desarrollo de aterosclerosis. Estos datos sugieren que TCZ mejora el estado general de los neutrófilos de modo que puedan ser menos propensos a experimentar NETosis. En un estudio reciente se ha observado que el tratamiento con TCZ reduce el número total de neutrófilos sin encontrar asociación temporal entre la reducción en el recuento de estas células y el desarrollo de infecciones graves en los pacientes tratados con TCZ¹⁷³.

Los LDGs son funcionalmente diferentes de los neutrófilos en la AR, con capacidades de compensación mejoradas⁴⁷, aumento de supervivencia y una disminución de la señalización del TNF, que pueden contribuir a la patología de la enfermedad y a la respuesta al tratamiento¹⁷⁴. Además, los LDGs muestran un fenotipo activado, induciendo la citotoxicidad de las células endoteliales y desempeñando por tanto un papel esencial en el desarrollo de enfermedad CV¹⁷⁵. Nuestros resultados muestran el efecto beneficioso de TCZ disminuyendo el porcentaje de LDGs en pacientes con AR, lo cual podría reducir el daño vascular inducido por estos subtipos de neutrófilos.

Los neutrófilos son el tipo celular más abundante del líquido sinovial y tienen un papel decisivo en el desarrollo de la inflamación en el contexto de la AR; nuestros resultados muestran que el bloqueo de la señalización del receptor de IL-6 con TCZ podría ser un tratamiento útil para evitar los efectos indeseados de la activación persistente de neutrófilos.

Por otro lado, este es el primer trabajo que evalúa el efecto directo de TCZ en los monocitos y los neutrófilos de pacientes con AR. Ya que en nuestro estudio in vivo los pacientes tomaban terapia combinada con FAMES sintéticos y TCZ, quisimos confirmar la especificidad de los efectos de esta terapia biológica sobre cada tipo de célula y cada parámetro analizado mediante la realización de estudios in vitro donde monocitos y neutrófilos aislados de pacientes AR con alta actividad

que no estaban tomando este fármaco (ni ningún otro FAME biológico), fueron tratados con TCZ, algo que debe considerarse un punto relevante para excluir el efecto que podrían ser atribuidos al resto de tratamientos que tomaban los pacientes.

Nuestros datos generales sugieren que TCZ mejora el perfil proaterotrombótico en pacientes con AR mediante la regulación simultánea de la dislipidemia, la DE y la actividad inflamatoria de monocitos y neutrófilos, a través de mecanismos implicados en la modulación del estrés oxidativo, NETosis y vías de señalización intracelular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inhibición de la señal del receptor de IL-6 mediante TCZ es un tratamiento efectivo para el control de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR, observándose un descenso en los parámetros clínico-analíticos de actividad, una reducción de los niveles de FR y una modulación del perfil lipídico tras 6 meses de tratamiento con este fármaco.
2. Nuestro estudio, realizado *in vivo* con pacientes AR e *in vitro* con células endoteliales, apoya la eficacia de TCZ en el restablecimiento de la función endotelial mediante el aumento del pico de flujo sanguíneo y del área hiperémica postoclusiva y la reducción de moléculas de adhesión, de mediadores inflamatorios y protrombóticos.
3. Este trabajo muestra la eficacia de TCZ en la reducción del estrés oxidativo a nivel celular, en los monocitos y neutrófilos de pacientes AR, observándose una reducción significativa de los niveles de peróxidos y peroxinitritos en ambas células tras 6 meses de tratamiento con este fármaco.
4. El tratamiento con TCZ reduce la actividad proinflamatoria, procoagulante y migratoria de los monocitos a través de la regulación de vías de señalización intracelular.
5. TCZ previene la generación de NETosis observada incrementada en pacientes con AR, mecanismo estrechamente relacionado con aterosclerosis y disfunción endotelial.

En resumen, TCZ es un fármaco que mejora el perfil proaterotrombótico en pacientes con AR mediante la regulación simultánea de la dislipidemia, la disfunción endotelial y la actividad inflamatoria de monocitos y neutrófilos, a través de mecanismos implicados en la modulación del estrés oxidativo, inflamación, NETosis y vías de señalización intracelular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-2219. doi:10.1056/NEJMra1004965.
2. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-361. doi:10.1038/nature01661.
3. Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE VW. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum*. 1984;27(8):864-72.
4. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(1):88-95. doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/41.1.88.
5. Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, et al. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4):551-558.
6. van Vollenhoven RF. Rheumatoid arthritis in 2012: Progress in RA genetics, pathology and therapy. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(2):70-72. doi:10.1038/nrrheum.2012.232.
7. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A, Kochi Y. Genetic studies of rheumatoid arthritis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2015;91(8):410-422. doi:10.2183/pjab.91.410.
8. Suzuki A, Yamamoto K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33:40-43.
9. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1976;57(5):1148-1157. doi:10.1172/JCI108382.
10. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):30-37. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B.
11. Seldin MF, Amos CI, Ward R GP. The genetics revolution and the assault on

rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42(6):1071-1079.

12. Mattey DL HD. Smoking and HLA-DR shared epitope alleles in rheumatoid arthritis: comment on the article by Padyukov et al. *Arthritis Rheum.* 52(11):3675-3676.
13. Karlson EW, Chang S-C, Cui J, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):54-60. doi:10.1136/ard.2008.102962.
14. Källberg H, Padyukov L, Plenge RM, et al. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):867-875. doi:10.1086/516736.
15. Oliveira RD, Junta CM, Oliveira FR, Silva LM, Donadi EA, Louzada P. Share epitope, citrullinated cyclic peptide antibodies and smoking in Brazilian rheumatoid arthritis patients. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;34(1):32-35. doi:10.1007/s12016-007-8017-2.
16. Padyukov L, Suva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3085-3092. doi:10.1002/art.20553.
17. Sanmarti R, Gomez-Centeno A, Ercilla G, et al. Prognostic factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a two year prospective study after a structured therapeutic strategy using DMARDs and very low doses of glucocorticoids. *Clin Rheumatol.* 2007;26(7):1111-1118. doi:10.1007/s10067-006-0462-4.
18. Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, et al. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM.* 1996;89(11):821-829. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977961?dopt=Citation>.
19. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on

- extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6):R1386-93. doi:10.1186/ar1837.
20. Diogo D, Okada Y, Plenge RM. Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(1):85-92. doi:10.1097/BOR.000000000000012.
 21. 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):466-471. doi:10.1056/nejm199308123290704.
 22. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Frisch M. Socioeconomic status and risk of rheumatoid arthritis: a Danish case-control study. *J Rheumatol*. 2006;33(6):1069-1074. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622905>.
 23. Bergstrom U, Jacobsson LTH, Nilsson J-A, Berglund G, Turesson C. Pulmonary dysfunction, smoking, socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(11):2005-2013. doi:10.1093/rheumatology/ker258.
 24. Rosell M, Wesley A-M, Rydin K, Klareskog L, Alfredsson L. Dietary fish and fish oil and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology*. 2009;20(6):896-901. doi:10.1097/EDE.0b013e3181b5f0ce.
 25. Pattison DJ, Harrison RA, Symmons DP. The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*. 2004;31:1310-1319.
 26. De Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*. 2008;35(1):70-76. doi:07/13/1123 [pii].
 27. Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Källberg H, Rönnelid J, Lundberg I, Klareskog L ALESG. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 69(6):1072-1076.
 28. Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tobacco and Other Environmental Risk Factors in

Rheumatoid Arthritis. *Reumatol Clínica (English Ed.* 2012;8(6):342-350. doi:10.1016/j.reumae.2012.06.007.

29. Alvaro-Gracia Alvaro JM. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rev Clin Esp.* 200(1):25-31.
30. Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the t cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992;35(7):729-735. doi:10.1002/art.1780350702.
31. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer L a, Fox D a. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):202. doi:10.1186/ar2107.
32. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(5):361-367. doi:10.1186/ar113.
33. Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, et al. TGF- β type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int Immunol.* 2007;19(2):117-126. doi:10.1093/intimm/dxl128.
34. van den Berg WB, van Lent PL. The role of macrophages in chronic arthritis. *Immunobiology.* 1996;195(4-5):614-623. doi:S0171-2985(96)80026-X [pii]\r10.1016/S0171-2985(96)80026-X.
35. Herrero-Beaumont G, Martínez Calatrava MJ, Castañeda S. Mecanismo de acción de abatacept: Concordancia con su perfil clínico. *Reumatol Clin.* 2012;8(2):78-83. doi:10.1016/j.reuma.2011.08.002.
36. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16). doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
37. Mulherin D1, Fitzgerald O BB. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39(1):115-124.
38. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B, Yanni G, Bresnihan B. Synovial

- tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis Rheum Dis*. 1994;53(53):39-44. doi:10.1136/ard.53.1.39.
39. Takemura S, Braun A, Crowson C, et al. Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *J Immunol*. 2001;167(2):1072-1080. doi:10.4049/jimmunol.167.2.1072.
 40. Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue. *Reumatol Clínica (English Ed)*. 2013;9(5):303-315. doi:10.1016/j.reumae.2013.02.004.
 41. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest*. 2000;106(12):1481-1488. doi:10.1172/JCI11176.
 42. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol*. 2003;170(Cii):2655-2662. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2655.
 43. Li H, Hong S, Qian J, Zheng Y, Yang J, Yi Q. Cross talk between the bone and immune systems: Osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+and CD8+ T cells. *Blood*. 2010;116(2):210-217. doi:10.1182/blood-2009-11-255026.
 44. 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(178):178ra40-178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580.
 45. Sur Chowdhury C, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(3):R122. doi:10.1186/ar4579.
 46. Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as

- source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2016;7(NOV). doi:10.3389/fimmu.2016.00485.
47. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: A distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):455-463. doi:10.1007/s00281-013-0375-7.
 48. Karmakar S, Kay J, Gravallese EM. Bone Damage in rheumatoid arthritis: Mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010;36(2):385-404. doi:10.1016/j.rdc.2010.03.003.
 49. Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: Pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol*. 2002;29(SUPPL. 65):3-9.
 50. Lubberts E. The IL-23–IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(7):415-429. doi:10.1038/nrrheum.2015.53.
 51. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe? *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:491974. doi:10.1100/2012/491974.
 52. Yoshida H, Yoshiyuki M, Hiroki Yoshida MY. Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev*. 2008;226(1):234-247. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00710.x.
 53. Sánchez S, López FJ, Carreño L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Elsevier, Doyma*. 2011;6(SUPPL. 3):20-24. doi:10.1016/j.reuma.2010.11.010.
 54. Cronstein BN. Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65 Suppl 1(Suppl 1):S11-5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17708739.
 55. Boss B NG. Correlation of IL-6 with the classical humoral disease activity parameters ESR and CRP and with serum cortisol, reflecting the activity of the HPA axis in active rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*. 2000;59(Suppl 2:II):62-4.

56. Dayer J-M, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(1):15-24. doi:10.1093/rheumatology/kep329.
57. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429-442. doi:10.1038/nri2094.
58. Saxena A CB. *Acute Phase Reactants and the Concept of Inflammation*. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, Eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Vol 1. 9th Ed. Philadelphia, PA Elsevier/Saunders.; 2013.
59. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448-457. doi:10.1038/ni.3153.
60. 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(10). doi:10.1371/journal.pone.0107886.
61. Asensi V, Valle E, Meana A, et al. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*. 2004;72(7):3823-3828. doi:10.1128/IAI.72.7.3823-3828.2004.
62. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka a K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*. 2000;1(6):510-514. doi:10.1038/82763.
63. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology(Oxford)*. 2012;51 Suppl 5(1462-0332 (Electronic)):v3-11. doi:10.1093/rheumatology/kes113.
64. Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS, Gold PW, Chrousos GP WR. Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(Apr):1279-1283.
65. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: All the way to treat

- autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1227-1236. doi:10.7150/ijbs.4666.
66. del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante a. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001;44(12):2737-2745. doi:10.1002/1529-0131(200112)44:12<2737::AID-ART460>3.0.CO;2-#.
67. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37(4):481-494. doi:10.1002/art.1780370408.
68. Holmqvist ME, Wedren S, Jacobsson LT, et al. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med.* 2010;268(6):578-585. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02260.x.
69. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining How “High-Grade” Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Circulation.* 2003;108(24):2957-2963. doi:10.1161/01.CIR.0000099844.31524.05.
70. Sattar N, McInnes IB. Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(3):286-292. doi:10.1097/01.bor.0000158150.57154.f9.
71. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(2):402-411. doi:10.1002/art.20853.
72. Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, et al. A symptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(8):1481-1488. doi:10.1002/1529-0131(199808)41:8<1481::AID-ART19>3.0.CO;2-O.
73. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(8):2423-2427. doi:10.1002/art.20431.

74. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA. Increased Prevalence of Severe Subclinical Atherosclerotic Findings in Long-Term Treated Rheumatoid Arthritis Patients Without Clinically Evident Atherosclerotic Disease. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(6):407-413. doi:10.1097/01.md.0000101572.76273.60.
75. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9709):132-140. doi:10.1016/S0140-6736(09)61717-7.
76. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet*. 2002;359(9313):1173-1177. doi:10.1016/S0140-6736(02)08213-2.
77. Jacobsson LT, Turesson C, Gülfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T et al. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32(7):1213-1218.
78. McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(6):410-417. doi:10.1038/nrcardio.2009.57.
79. Barbarroja N, Pérez-Sánchez C, Ruiz-Limon P, et al. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(12):2706-2716. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304475.
80. Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N, Fernández-Hernando C. MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2013;64:31-39. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.014.
81. Filková M, Jüngel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*. 2012;26(3):131-141. doi:10.2165/11631480-000000000-00000.

82. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*. 2008;14(3):109-119. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.007.
83. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(5):878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
84. López-Pedrerera C, Barbarroja N, Jimenez-Gomez Y, Collantes-Estevez E, Aguirre MA, Cuadrado MJ. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with anti-phospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology (Oxford)*. 2016. doi:10.1093/rheumatology/kew054.
85. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of Disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(2):99-106. doi:10.1038/ncprheum0092.
86. López-Pedrerera C, Barbarroja N, Villalba JM. Novel biomarkers of atherosclerosis and cardiovascular risk in autoimmune diseases: Genomics and proteomics approaches. *Proteomics - Clin Appl*. 2009;3(2):213-225. doi:10.1002/prca.200800147.
87. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
88. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet (London, England)*. 1992;340(8828):1111-1115. doi:10.1016/0140-6736(92)93147-F.
89. Libby P. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143. doi:10.1161/hc0902.104353.
90. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: A disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35(1):8-17. doi:10.1016/j.semarthrit.2005.03.004.

91. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction : the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012;23(4):222-231. doi:10.5830/CVJA-2011-068.
92. González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA. Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(3):R101. doi:10.1186/ar3382.
93. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11324-11349. doi:10.3390/ijms150711324.
94. Alley H, Owens CD, Gasper WJ, Grenon SM. Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery in Clinical Research. *J Vis Exp.* 2014;(92). doi:10.3791/52070.
95. Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu Rev Nutr.* 1996;16(1):33-50. doi:10.1146/annurev.nutr.16.1.33.
96. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circ J.* 2009;73(6):977-985. doi:JST.JSTAGE/circj/CJ-09-0274 [pii].
97. Y.H. R, C.P. C, A. O, et al. Interaction between oxidative stress and high-density lipoprotein cholesterol is associated with severity of coronary artery calcification in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2010;62(10):1473-1480. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L359717951%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1002/acr.20237%5Cnhttp://elvis.uvu.vu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=15290131&id=doi:10.1002%2Facr.20237&atitle=Interaction+between+oxidative+stre>.
98. Khan F, Siddiqui AA. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta.* 2006;370(1-2):100-107. doi:10.1016/j.cca.2006.01.020.
99. Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and

autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell Biochem.* 2008;49:325-350.

100. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008;27(2):141-145. doi:10.1007/s10067-007-0746-3.
101. Mikuls TR, Gould KA, Bynoté KK, et al. Anticitrullinated protein antibody (ACPA) in rheumatoid arthritis: influence of an interaction between HLA-DRB1 shared epitope and a deletion polymorphism in glutathione s-transferase in a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R213. doi:10.1186/ar3190.
102. Ediz L, Hiz O, Ozkol H, Gulcu E, Toprak M, Ceylan MF. Relationship between anti-CCP antibodies and oxidant and anti-oxidant activity in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Med Sci.* 2011;8(2):139-147. doi:10.7150/ijms.8.139.
103. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-).* 2004;303(5663):1532-1535. doi:10.1126/science.1092385.
104. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Sci STKE.* 2007;2007(379):pe11-pe11. doi:10.1126/stke.3792007pe11.
105. Badimon L VG. Neutrophil extracellular traps: a new source of tissue factor in atherothrombosis. *Eur Hear J.* 2015;36 (22)(jun):1364-1366.
106. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783. doi:10.1161/ATVBAHA.111.242859.
107. Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1854-1863. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203430.

108. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI, et al. Von willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(7):1382-1389. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303016.
109. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):136-144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
110. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835. doi:10.1084/jem.20112322.
111. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010;584(14):3193-3197. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.006.
112. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol.* 2011;187(1):538-552. doi:10.4049/jimmunol.1100450.
113. Biological response modifier agents for adults with rheumatoid arthritis. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Disponible en: http://www.cadth.ca/media/pdf/TR_RA_Clinical_and_Economic_Overview_e.pdf.
114. Scott D, Wolfe F, Huizinga T. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010;376(9746):1094-1108. doi:10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
115. Sanmartí R, García-Rodríguez S, Álvaro-Gracia JM, et al. 2014 update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the use of biological therapies in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin.* 2015;11(5):279-294. doi:10.1016/j.reuma.2015.05.001.
116. Al-Shakarchi I, Gullick NJ, Scott DL. Current perspectives on tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis: A review. *Patient Prefer Adherence.* 2013;7:653-666. doi:10.2147/PPA.S41433.

117. Gaffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Heal Pharm*. 2006;63(24):2451-2465. doi:10.2146/ajhp050514.
118. Protogerou AD, Zampeli E, Fragiadaki K, Stamatelopoulos K, Papamichael C, Sfikakis PP. A pilot study of endothelial dysfunction and aortic stiffness after interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):734-736. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.015.
119. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 2008;29(4):628-636. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.018.
120. Samson M, Audia S, Janikashvili N, et al. Brief report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2499-2503. doi:10.1002/art.34477.
121. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;181:151-160. doi:10.1007/978-3-540-73259-4-7.
122. Pasare C. Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science (80-)*. 2003;299(5609):1033-1036. doi:10.1126/science.1078231.
123. Singh J a, Beg S, Lopez-Olivo MA. Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol*. 2011;38(7):10-20. doi:10.3899/jrheum.100717.
124. Patel AM, Moreland LW. Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: A review of tocilizumab therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:263-278. doi:10.2147/DDDT.S14099.
125. Choy EHS, Isenberg DA, Garrood T, et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*. 2002;46(12):3143-3150. doi:10.1002/art.10623.

126. Emery P, Keystone E, Tony HP, et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *AnnRheumDis*. 2008;67(1468-2060 (Electronic)):1516-1523.
127. MC G, JD M, EL N, et al. - Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2968-2980.
128. RN M, PC T, J S, et al. - Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2817-2829.
129. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody - A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *ARTHRITIS Rheum*. 2004;50(6):1761-1769. doi:10.1002/art.20303.
130. Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Murata N, van der Heijde D KT. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(9):1162-1167.
131. N N, N M, K Y, et al. - Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2009;19:12-19.
132. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 2008;371(9617):987-997. doi:10.1016/S0140-6736(08)60453-5.
133. Jones G, Sebba A, Gu J, et al. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):88-96. doi:10.1136/ard.2008.105197.
134. Fleischmann R, Burgos-Vargas R AE. No Title. In: *Tocilizumab Inhibits*

Radiographic Progression and Improves Physical Function in Rheumatoid Arthritis Patients at 2years with Increasing Clinical Efficacy over Time. Proceedings of the American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting. ; :17-21.

135. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-324. doi:10.1002/art.1780310302.
136. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-2581. doi:10.1002/art.27584.
137. Farley K, Stolley JM, Zhao P, Cooley J, Remold-O'Donnell E. A SerpinB1 Regulatory Mechanism Is Essential for Restricting Neutrophil Extracellular Trap Generation. *J Immunol.* 2012;189(9):4574-4581. doi:10.4049/jimmunol.1201167.
138. Yan H, Zhou HF, Akk A, et al. Neutrophil Proteases Promote Experimental Abdominal Aortic Aneurysm via Extracellular Trap Release and Plasmacytoid Dendritic Cell Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(8):1660-1669. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307786.
139. Malemud CJ. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol.* 2013;4:160. doi:10.4172/2155-9899.1000160.
140. Iannone F, Lopalco G, Cantarini L, Galeazzi M, Lapadula G. Efficacy and safety of combination therapy for preventing bone damage in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2016;35(1):19-23. doi:10.1007/s10067-015-3120-x.
141. Strang AC, Bisoesndial RJ, Kootte RS, et al. Pro-atherogenic lipid changes and decreased hepatic LDL receptor expression by tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2013;229(1):174-181. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.031.
142. Gabay C, McInnes IB, Kavanaugh A, et al. Comparison of lipid and lipid-

associated cardiovascular risk marker changes after treatment with tocilizumab or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(10):1806-1812. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207872.

143. Provan SA, Berg IJ, Hammer HB, Mathiessen A, Kvien TK, Semb AG. The impact of newer biological disease modifying anti-rheumatic drugs on cardiovascular risk factors: A 12-month longitudinal study in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab, abatacept and tocilizumab. *PLoS One*. 2015;10(6). doi:10.1371/journal.pone.0130709.
144. Souto A, Salgado E, Maneiro JR, Mera A, Carmona L, Gómez-Reino JJ. Lipid profile changes in patients with chronic inflammatory arthritis treated with biologic agents and tofacitinib in randomized clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2015;67(1):117-127. doi:10.1002/art.38894.
145. Kume K, Amano K, Yamada S, Hatta K, Ohta H, Kuwaba N. Tocilizumab monotherapy reduces arterial stiffness as effectively as etanercept or adalimumab monotherapy in rheumatoid arthritis: An open-label randomized controlled trial. *J Rheumatol*. 2011;38(10):2169-2171. doi:10.3899/jrheum.110340.
146. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Mihara M. Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: Effect on the expression of chemokine and adhesion molecule. *Rheumatol Int*. 2010;30(3):309-315. doi:10.1007/s00296-009-0953-0.
147. Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF- α antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(1):73-80.
148. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2008;28(3):245-251. doi:10.1007/s00296-007-0419-1.
149. 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(12):4041-4045. doi:10.1007/s00296-011-2135-0.

150. Gualtierotti R, Ingegnoli F, Griffini S, Grovetti E, Meroni PL, Cugno M. Prothrombotic biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: The beneficial effect of IL-6 receptor blockade. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(3).
151. McInnes IB, Thompson L, Giles JT, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on surrogates of vascular risk in rheumatoid arthritis: MEASURE, a randomised, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(4):694-702. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204345.
152. Tono T, Aihara S, Hoshiyama T, Arinuma Y, Nagai T, Hirohata S. Effects of anti-IL-6 receptor antibody on human monocytes. *Mod Rheumatol.* 2015;25(1):79-84. doi:10.3109/14397595.2014.914016.
153. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N KT. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood.* 2008;112(10)(Nov):3959-3964.
154. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2009;1791(6):540-551. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005.
155. Herker E OM. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(4)(Jan):2280-2287.
156. Svenson KL, Pollare T, Lithell H, Hallgren R. Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: relationship to peripheral insulin resistance. *Metabolism.* 1988;37(2):125-130. doi:S0026-0495(98)90005-1 [pii].
157. Dessein PH, Joffe BI. Insulin resistance and impaired beta cell function in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2765-2775. doi:10.1002/art.22053.
158. Giles JT, Danielides S, Szklo M, et al. Insulin resistance in rheumatoid arthritis: Disease-related indicators and associations with the presence and progression

- of subclinical atherosclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):626-636. doi:10.1002/art.38986.
159. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(3):1154-1159. doi:10.1210/jcem.86.3.7305.
160. Schultz O, Oberhauser F, Saech J, et al. Effects of inhibition of interleukin-6 signalling on insulin sensitivity and lipoprotein (A) levels in human subjects with rheumatoid diseases. *PLoS One.* 2010;5(12). doi:10.1371/journal.pone.0014328.
161. Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. ALTERNATIVE PATHWAY OF INSULIN SIGNALING IN MICE WITH TARGETED DISRUPTION OF THE IRS-1 GENE. *Nature.* 1994;372:186-190. doi:10.1038/372186a0.
162. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1992;90(5):1839-1849. doi:10.1172/JCI116060.
163. Anai M, Funaki M, Ogihara T, et al. Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes.* 1998;47(1):13-23. doi:10.2337/diabetes.47.1.13.
164. Okamoto H, Kobayashi A. Tyrosine kinases in rheumatoid arthritis. *J Inflamm (Lond).* 2011;8(1):21. doi:10.1186/1476-9255-8-21.
165. Lewis AC MC. Correction of dysfunctional apoptosis in arthritis by pharmacologic intervention: Focus on altering the activity of inhibitor of apoptosis proteins. *Recent Res Devel Pharmacol.* 2011;2:69-84.
166. Mayer BA, Rehberg M, Erhardt A, et al. Inhibitor of apoptosis proteins as novel targets in inflammatory processes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(10):2240-2250. doi:10.1161/ATVBAHA.111.234294.
167. Caramés B, López-Armada MJ, Cillero-Pastor B, et al. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human

- articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(6):715-722. doi:10.1016/j.joca.2007.10.006.
168. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007;178:2623-2629. doi:178/5/2623 [pii].
169. Wisler BA, Dennis JE MC. New organ-specific pharmacological strategies interfering with signaling pathways in inflammatory disorders/ autoimmune disorders. *Curr Signal Transduct Ther.* 2011;6:279-291.
170. Biffi WL, Moore EE, Moore F a, Barnett CC. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol.* 1995;58(5):582-584.
171. Afford SC, Pongracz 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(30):21612-21616.
172. McNamee JP, Bellier P V., Kutzner BC, Wilkins RC. Effect of pro-inflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture. *Cytokine.* 2005;31(2):161-167. doi:10.1016/j.cyto.2005.05.001.
173. 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. *Rheumatol.* 2016.
174. Wright HL, Makki FA, Moots RJ, Edwards SW. Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signalling. *J Leukoc Biol.* 2017;101(2):599-611. doi:10.1189/jlb.5A0116-022R.
175. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ KM. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol.* 2010;185(6)(sep):3779.

ANEXOS

ANEXOS

La presente tesis doctoral ha derivado en la publicación de un artículo, tres comunicaciones a congresos, uno nacional y dos internacionales y una comunicación a unas jornadas de investigación.

1. Ruiz-Limón P¹, Ortega R¹, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MDC, Perez-Sanchez C, Jimenez-Gomez Y, Peralbo-Santaella E, Font P, Ruiz-Vilches D, Ferrin G, Collantes-Estevez E, Escudero-Contreras A, López-Pedrerera C², Barbarroja N².

Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation.

¹These authors share the first position. ²These authors share the senior position

Transl Res. 2017 May;183:87-103. doi: 10.1016/j.trsl.2016.12.003. Epub 2016 Dec 9.

Published online: December 09, 2016, Accepted: December 2, 2016

Received in revised form: November 24, 2016, Received: June 30, 2016

2. 42 Congreso de la Sociedad Española de Reumatología, celebrado en Barcelona, del 18 al 21 de Mayo 2016.

Aceptado como póster: Póster número 184: TCZ PREVIENE LA ATEROTROMBOSIS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE MEDIANTE SU ACCIÓN DIRECTA SOBRE LA GENERACIÓN DE NETOSIS Y LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA MEDIADA POR LOS MONOCITOSN.

P. Ruiz-Limón, R. Ortega, C. Pérez-Sánchez, Y. Jiménez-Gómez, M. Ábalos-Aguilera, I. Arias de la Rosa, P. Font, M. Aguirre, J. Calvo, C. Castro, E. Collantes-Estévez, A. Escudero, N. Barbarroja y C. López-Pedrerera

Servicio de Reumatología. IMIBIC/Hospital Reina Sofía. Universidad de Córdoba.

Publicado Abstract en: Reumatol Clin. 2016;12(Espec Cong):27-254

Financiado por CTS7940, PI2013-0191, CP15/00158, PI15/01333.

3. EULAR Congress 2016, celebrado en Londres, Inglaterra, del 8 al 11 de Junio de 2016.

Comunicación pósterl. [FRI0046] TCZ ATTENUATES ATHEROTHROMBOSIS THROUGH THE SPECIFIC INHIBITION OF NETOSIS AND MONOCYTE-MEDIATED PROINFLAMMATORY ACTIVITY

P. Ruiz-Limon, N. Barbarroja, R. Ortega, C. Perez-Sanchez, Y. Jimenez-Gomez, M.C. Abalos-Aguilera, I. Arias de la Rosa, P. Font, M.A. Aguirre, M.C. Castro, J. Calvo, E. Collantes-Estevez, A. Escudero, C. Lopez-Pedrerera. Rheumatology service, IMIBIC/University of Cordoba/Reina Sofia Hospital, Cordoba, Spain

Publicado Abstract en Ann Rheum Dis2016;75(Suppl2): 442.

DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.2545

4. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, celebrado en Washington, del 11 al 16 de Noviembre de 2016.

Comunicación poster: Póster número 2599: TCZ IMPROVES THE PRO-ATHEROTROMBOTIC PROFILE OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS MODULATING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, NETOSIS AND INFLAMMATION

Patricia Ruiz-Limon¹, Rafaela Ortega-Castro², IVÁN ARIAS DE LA ROSA², Carlos Perez-Sanchez², Yolanda Jiménez-Gómez², Maria Carmen Abalos-Aguilera¹, Pilar Font-

Ugalde², Eduardo Collantes-Estévez², Alejandro Escudero-Contreras², Chary Lopez-Pedreira² and Nuria Barbarroja², ¹Rheumatology Service, IMIBIC/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain, ²Rheumatology service, IMIBIC/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain
Publicado Abstract en Arthritis & Rheumatology Volume 68, Issue Supplement S10, Pages 1-4550, October 2016. Supplement: 2016 ACR/ARHP Annual Meeting Abstract Supplement.

5. VII Jornadas de jóvenes investigadores investigación biomédica celebradas en Córdoba Mayo 2016. Comunicación poster: P23.

Tocilizumab might prevent cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients through the modulation of endothelial dysfunction, NETosis and monocyte-mediated inflammation.

Authors: Ruiz-Limon P, Ortega R, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, Perez-Sanchez C, Gimenez-Gomez Y, Peralbo-Santaella E, Font P, Ruiz-Vilches D, Ferrin G, Collantes-Estévez E, Escudero-Contreras A, Lopez Pedreira Ch, Barbarroja N. Group: GC5 Systemic and chronic inflammatory autoimmune diseases of the locomotor system and connective tissue.



Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation

PATRICIA RUIZ-LIMÓN¹, RAFAELA ORTEGA¹, IVAN ARIAS DE LA ROSA, MARIA DEL CARMEN ABALOS-AGUILERA, CARLOS PEREZ- SANCHEZ, YOLANDA JIMENEZ- GOMEZ, ESTHER PERALBO-SANTAELLA, PILAR FONT, DESIREE RUIZ-VILCHES, GUSTAVO FERRIN, EDUARDO COLLANTES-ESTEVEZ, ALEJANDRO ESCUDERO-CONTRERAS, CHARY LÓPEZ- PEDRERA², and NURIA BARBARROJA²

CÓRDOBA, SPAIN

Tocilizumab (TCZ) is an effective treatment for rheumatoid arthritis (RA). However, the changes that occurred after TCZ therapy on endothelial dysfunction, monocyte activity, NETosis, and oxidative stress, the principal effectors of atherosclerosis and cardiovascular disease, have not been analyzed yet. A total of 20 RA patients received 162 mg per week subcutaneous TCZ for 6 months. Endothelial function was measured through postocclusive hyperemia using Laser Doppler. Oxidative stress markers in monocytes and neutrophils were analyzed by flow cytometry. NETosis was measured through SYTOX staining of DNA fibers and the expression of myeloperoxidase and neutrophil elastase. Percentage of low-density granulocytes was analyzed through flow cytometry. Gene expression and phosphorylation of intracellular pathways was analyzed in monocytes. TCZ improved endothelial function and decreased oxidative stress in RA leukocytes. Percentage of low-density granulocytes and NETosis generation were reduced. The proinflammatory and prothrombotic status of RA monocytes was also reversed through a modulation of specific intracellular pathways. All these results were recapitulated after *in vitro* treatment with TCZ of monocytes and neutrophils purified from RA patients and cocultured with endothelial cells. TCZ might reduce the proatherothrombotic profile in RA patients through the restoration of the endothelial function, oxidative stress reduction, inhibition of monocytes' prothrombotic and inflammatory profile, and abridged NETosis generation. (Translational Research 2017;183:87–103)

Abbreviations: ACR = American College of Rheumatology; ADRP = Adipophilin; AH = Hyperemic area; AKT1S1 = AKT1 substrate 1; Anti-TNF α = Antitumor Necrosis Factor alpha; AO = Occlusion area; BBE = Bovine brain extract; BDMARDs = Biologic DMARDs; BZ = Biological zero; CO₂ = Carbon dioxide; CRP = C-reactive protein; Ct = Threshold cycle value; CVD = Cardiovascular disease; DAS28 = Disease activity score 28; DGAT = Diacylglycerolacyltransferase; EBM = Endothelial Cell Basal medium; ED = Endothelial dysfunction; ESR = Erythrocyte sedimentation rate; FITC = Fluorescein isothiocyanate; GSH = Intracellular glutathione; HAQ = Health assess-

¹These authors share the first position.

²These authors share the senior position.

From the Rheumatology Service, Maimonides Institute for biomedical research in Cordoba (IMIBIC)/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain; Microscopy, cytomics and scientific imaging unit, IMIBIC, Cordoba, Spain; Biomedical Research Centre Network, Digestive and Liver Diseases (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain.

Submitted for publication June 30, 2016; revision submitted November 24, 2016; accepted for publication December 2, 2016.

Reprint requests: Nuria Barbarroja, IMIBIC, GC05 Group 2^o floor, Avda. Menendez Pidal s/n, E-14006 Córdoba, Spain; e-mail: nuria.barbarroja.exts@juntadeandalucia.es.

1931-5244/\$ - see front matter

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.12.003>

ment questionnaire; HDL = High-density lipoprotein; hEGF = Human epidermal growth factor; HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1; IL = Interleukin; IRS = Insulin receptor substrate; LDGs = Low-density granulocytes; LDL = Low-density lipoprotein; MAb = Monoclonal antibody; MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1; MFI = Mean fluorescence intensity; mL-6R = Membrane IL-6 receptor; MPO = Myeloperoxidase; NE = Neutrophil elastase; NETs = Neutrophil extracellular traps; NF = Normal flow; NOS = Nitric oxide synthase; NOX = NADPH oxidase; NSAIDs = Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OD = Optical density; p-p38 = Phospho mitogen-activated protein kinase 14; PAD4 = Peptide arginine deiminase, type IV; PF = Peak flow; pGSK-3 β = Phospho glycogen synthase kinase 3 beta; pHSP27 = Phospho heat shock protein 27; PKB/AKT = Phospho protein kinase B; PMBCs = Peripheral mononuclear blood cells; pmTOR = Phospho mechanistic target of rapamycin; PORH = post-occlusive reactive hyperemia; pPRAS40 = Proline-rich Akt substrate; PRKAA1/pAMPK α = Phospho protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1; pSTAT3 = Phospho signal transducer and activator of transcription 3; RA = Rheumatoid arthritis; RF = Rheumatoid factor; sDMARDs = Synthetic DMARDs; sIL-6R = Soluble IL-6 receptor; TCZ = Tocilizumab; TF = Tissue factor; TH1 = Time to half before hyperemia; TH2 = Time to half after hyperemia; TLR = Toll-like receptor; TM = Time to max; TNF α = Tumor necrosis factor α ; VAS = Visual analogue scale; VCAM = Vascular cell adhesion molecule; VEGF = Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a complex onset autoimmune disease with many associated comorbidities, including cardiovascular disease (CVD), which significantly contributes to morbidity and mortality in these patients causing the 39%–50% of deaths.¹ Atherosclerosis at an early stage of the disease is considered a potential preclinical manifestation. In fact, the risk of CVD events, such as myocardial infarction, is increased in the 2 years preceding the formal diagnosis of RA² and once the disease is diagnosed, the risk of having carotid plaques and CVD events increase with the progression of the disorder.³ The mechanisms responsible for the development of premature atherosclerosis in RA are not well understood, but traditional risk factors alone are not fully accountable and a role for inflammation has been suggested in this process. Thus, it is likely that inflammatory mediators might be causal in the accelerated atherosclerosis observed in this autoimmune disease, which is further secondary to endothelial dysfunction (ED) and CVD.⁴

Endothelial dysfunction (ED) is a vascular abnormality frequently presented in RA patients contributing to plaque initiation and progression. It is associated with carotid intima media thickness in long-standing RA.^{5,6} The phenotypic features of ED comprise upregulated expression of cellular adhesion molecules and compromised barrier function leading to increased leukocyte diapedesis, increased vascular smooth muscle tone—secondary to impaired processing of vasodilator substances such as nitric oxide and prostacyclin—and increased production of vasoconstrictor substances including endothelin.⁷

A number of processes have been linked to the development of ED and atherosclerosis in RA. Among them, increased neutrophil extracellular traps (NETs) have been proposed as a potential mechanism in the occur-

rence of CVD events. NETosis is a way of cell death, different from necrosis and apoptosis, in which occurs the dissolution of internal membranes, followed by the decondensation of chromatin and the release of NETs—networks of chromatin and granular contents of neutrophils, including histones, antimicrobial peptides, and oxidant-generating enzymes, such as neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), NADPH oxidase, and nitric oxide synthase (NOS)—to the extracellular space. The formation of NETs might induce ED and vascular damage in RA patients through stimulation of inflammatory responses, comprising the increased expression of adhesion molecules, cytokines, and chemokines and thus leading to the development of premature atherosclerosis and CVD.^{8–11}

Oxidative stress is another process frequently altered in RA, which also contributes to atherosclerosis. We have previously described a pro-oxidative status and an impairment of antioxidant capacity in RA patients at both plasma and cellular levels covering mitochondrial depolarization, increased reactive oxygen species and peroxynitrite levels, and lower levels of intracellular glutathione (GSH) in neutrophils and monocytes from RA patients. Moreover, we demonstrated a close relationship between anti-CCP levels and inflammation, so that they act as direct inductors of the pro-oxidative status and the inflammatory and atherogenic profile of lymphocytes, monocytes, and neutrophils in patients with RA.¹²

Many different cell components can be considered as key elements in the inflammatory and proatherothrombotic status of RA patients. Among them, macrophages have been demonstrated to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Various parameters of circulating monocytes, including count, increased adhesive properties, lipid metabolism alterations, phagocytosis, and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol,

AT A GLANCE COMMENTARY

Ruiz-Limón P, et al.

Background

Inhibition of the interleukin-6 (IL-6) receptor signaling by tocilizumab (TCZ) is an effective treatment for rheumatoid arthritis (RA).

Translational Significance

- Inhibition of IL-6R signal reduces oxidative stress in leukocytes of RA patients.
- TCZ markedly reduced the proinflammatory and procoagulant properties and migratory capacity of RA monocytes through the downregulation of the main signaling pathways associated with RA pathogenesis: JAK/STAT, SAPK/MAPK, and PI3K/AKT/mTOR.
- IL-6R inhibition reduced *in vivo* and *in vitro* NETosis generated by neutrophils, a process intimately associated with atherosclerosis and endothelial dysfunction.
- We show evidence through *in vivo* and *in vitro* studies (cocultures of monocytes from patients with endothelial cells) of the efficacy of TCZ improving the endothelial function and inhibiting inflammation and cell adhesion in the context of RA.

are associated with CVD.^{13,14} Moreover, monocytes/macrophages are central players in inflammation and have been found to be activated in RA through the release of cytokines and massive infiltration in the inflammatory sites such as synovial membranes.^{15,16} Thus, the progressive generation of inflammatory monocytes is an intrinsic element in the immune response mediating RA,¹⁷ and this response provides lipid deposits with effector cells that accelerate the development of advanced atherosclerotic vascular disease. Therefore, treatments targeting monocytes-macrophages might contribute to effectively prevent cardiovascular events.

Although antitumor necrosis factor alpha (anti-TNF α) therapy has significantly improved the outlook for patients suffering from RA, a substantial proportion of patients fail to respond to these therapies which implies that treatment response is likely to be multifactorial.¹⁸ Thus, new therapies are being evaluated. Interleukin-6 (IL-6) is an upstream inflammatory cytokine that plays a central role in propagating the downstream inflammatory response inducing atherosclerosis as it is implicated in ED and arterial stiffening contributing to accelerated

atherosclerosis process in RA patients.¹⁹ Moreover, it has a role in the differentiation of B lymphocytes into autoantibody producing plasma cells, which participate in the pathogenesis of RA through the formation of immune complexes.²⁰ High levels of IL-6 may cause a Th1-Th17/T-reg cell imbalance during RA, which is corrected on treatment with tocilizumab (TCZ),^{21,22} a recombinant humanized antihuman IL-6 receptor monoclonal antibody (mAb) that acts by binding both soluble and membrane IL-6 receptors (sIL-6R and mIL-6R), blocking the proinflammatory effects of IL-6.²³

A number of studies have delineated the effect of TCZ on lymphocyte activation in RA patients. Yet, the changes that occurred after anti-IL-6R therapy on monocyte activity, NETosis, and oxidative stress, the principal effectors of ED, atherosclerosis, and CVD in this autoimmune condition, have not been analyzed. We undertook this study to evaluate the molecular and cellular mechanisms underlying the effects of TCZ on the proatherothrombotic profile associated with RA, focusing on the effects of this biological therapy on ED and neutrophil and monocyte activities.

MATERIAL AND METHODS

This article conforms to the relevant ethical guidelines for human research.

RA patients. A total of 20 RA patients were included in this study. The RA patients fulfilled at least 4 1987 American College of Rheumatology criteria and achieved a total score of 6 or greater according to 2010 criteria.²⁴ The patients were taking the following treatments: corticosteroids (62.5%), leflunomide (30.0%), hydroxychloroquine (12.5%), NSAIDs (75.0%), methotrexate (63.5%), and vitamin D (18.0%). Patients having inadequate response or intolerance to conventional DMARDs were given subcutaneous TCZ (162 mg per week) for 6 months. The treatment of those patients with synthetic DMARDs, NSAIDs, or/and corticoids had been stable for at least 2 months before TCZ administration and was not modified during TCZ treatment.

All patients were tested for the presence of anti-CCPs and rheumatoid factor (RF). Disease activity score 28 (DAS28) index was determined following the guidelines of the American College of Rheumatology indications. Moderate to high activity was defined as DAS28 \geq 3.2.²⁵ All the patients filled the health assessment questionnaire and the visual analogue scale (VAS) to assess the pain. Changes from baseline in DAS28, VAS, health assessment questionnaire, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein levels, and tender and swollen joints were analyzed.

All participants enrolled were Caucasian, recruited at the Department of Rheumatology, and gave their written informed consent approved by the Ethical Committee of the Reina Sofia Hospital (Cordoba, Spain).

Endothelial function: Laser Doppler linear Periflux 5010. The study of microvascular function was performed by laser doppler flowmetry, analyzing the response to reactive hyperemia, so as the increase in blood flow occurred after temporary occlusion of blood flow, using a skin probe attached to the inner forearm. Postocclusive reactive hyperemia test consisted of 2 minutes of baseline followed by a 4-minute occlusion period. The cuff was then released and the postocclusive reactive hyperemia response was analyzed for 3 minutes.

Several parameters were obtained: normal flow (NF), perfusion when occluded (BZ), occlusion area (OA), time to half before hyperemia, highest perfusion value after occlusion was released (PF), time to half after hyperemia, and hyperemic area (HA).

White blood cells isolation. Neutrophils were isolated from patients by density centrifugation over Dextran-Ficoll Hypaque, which allowed cells to keep a nonactivated state. Thereafter, the separation of monocytes and lymphocytes from the mononuclear layer was performed by the immunomagnetic depletion of nonmonocytes using a commercially available kit (Monocyte isolation kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purity of the fractions was evaluated via flow cytometry (FACScalibur cytometer) by analyzing the size and complexity of each population (forward and side scatters). The purity of monocytes was further evaluated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD14 antibody by flow cytometry. By this method, 95.2 ± 4.3 viable monocytes were obtained.

In vitro studies. Monocytes and neutrophils purified from 5 RA patients at baseline (not taking TCZ) were cultured separately in RPMI 1640 containing 10% FBS, 2 mM l-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 mg ml⁻¹ streptomycin, and 250 pgml⁻¹ fungizone (Bio-Whittaker/MA Bioproducts, Walkersville, Md) at 37°C in a humidified 5% carbon dioxide (CO₂) atmosphere.

For mRNA and protein expression analyses, RA monocytes (1×10^6 cells ml⁻¹) were pretreated with FCRII blocking (Miltenyi Biotec) for 15 minutes. Then, cells were washed with 1 mL of PBS and centrifuged at 300 g for 10 minutes. Thereafter, cells were seeded and incubated with IL-6 (10 ngml⁻¹) for 9 hours and then incubated in the presence or in the absence of TCZ (20 µg ml⁻¹) for 9 hours. RA neutrophils (1×10^6 cells ml⁻¹) were pretreated with FCRII blocking as described above. Then, cells were seeded and

incubated with IL-6 (10 ngml⁻¹) for 3 hours and thereafter incubated in the presence or in the absence of TCZ (20 µg ml⁻¹) for 3 hours at 37°C in a humidified 5% (CO₂) atmosphere.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in Endothelial Cell Basal medium (EBM; Lonza, Walkersville, Md) with 10% FBS, 0.1% human epidermal growth factor (hEGF), 0.1% hydrocortisone, 0.1% gentamicin, amphotericin-B (GA-1000), 0.4% bovine brain extract, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 mg ml⁻¹ streptomycin, and 250 pgml⁻¹ fungizone (BioWhittaker/MA Bioproducts, Walkersville, Md) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

For *in vitro* studies, HUVECs were seeded into 6-well plates (4×10^5 cells per well) in 1.5 ml of complete medium. After 24 hours, cells were pretreated for 15 minutes with FCRII blocking Reagent (Miltenyi Biotec), and subsequently incubated with IL-6 (10 ngml⁻¹) for 9 hours and thereafter incubated in the presence or in the absence of TCZ (20 µg ml⁻¹) for 9 hours. The cultured cells were harvested for total RNA isolation and applied to RT-PCR studies.

Cocultures of RA monocytes-HUVEC. HUVECs were cultured as described above. Monocytes isolated from 5 RA patients at baseline (no taking TCZ) were pretreated with FCRII blocking reagent for 15 minutes. Then, monocytes were washed with 1–2 mL of PBS, centrifuged at 300 g for 10 minutes, and seeded into transwell inserts (Corning Transwell polycarbonate membrane cell culture inserts, Sigma-Aldrich, Mo) (1×10^6 cells per transwell) in EBM Endothelial Cell Basal medium, and added into multiple plate wells preloaded with HUVEC. Thus, HUVEC and monocytes shared the same culture medium but were physically separated. Coculture was incubated with IL-6 (10 ngml⁻¹) alone or combined with TCZ (20 µg ml⁻¹) as described previously. The cocultured cells (RA monocytes and HUVEC) were harvested separately for total RNA isolation and applied to subsequent RT-PCR.

RNA isolation and quantitative real-time reverse transcriptase PCR. Total RNA from monocytes, neutrophils, and endothelial cells was extracted using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) following the manufacturer's recommendations. The integrity of RNA was verified by optical density (OD) absorption ratio OD260/OD280 between 1.8 and 2.0.

For first-strand cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using random hexamers as primers and transcriptor reverse transcriptase (Qiagen, Madrid, Spain). Gene expression was assessed by real-time PCR using a LightCycler Thermal Cycler System (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind). The reaction was performed, following the manufacturer's protocol, in a final volume of 12 µL.

The reactions consisted of an initial denaturing of 10 minutes at 95°C, then 40 cycles of 15-second denaturing phase at 95°C, and 1-minute annealing and extension phase at 60°C. A threshold cycle (Ct value) was obtained for each amplification curve and a Δ Ct value was first calculated by subtracting the Ct value for human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA from the Ct value for each sample and transcript. Fold changes compared with the endogenous control were then determined by calculating $2^{-\Delta$ Ct. Samples were analyzed in triplicate and negative controls were included in all the reactions. Test reproducibility for all investigated transcripts was less than 0.5% in intertest experiments and even lower in intratest experiments.

Genes related to inflammation (tissue factor [TF], monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], IL-8, TNF α , IL-1 β , and IL-6), lipid metabolism and storage (toll-like receptor [TLR] 2, TLR4, diacylglycerolacyltransferase [DGAT], adipophilin [PLIN2], insulin signaling [IRS-1 and IRS-2]), and cell adhesion (intercellular adhesion molecule-1 [ICAM], vascular cell adhesion molecule [VCAM], and vascular endothelial growth factor [VEGF]) were evaluated.

Determination of oxidative stress biomarkers in white blood cells. Oxidative stress biomarkers were analyzed in monocytes and neutrophils using a dual-laser FACSCalibur (Becton Dickinson). Test standardization and data acquisition analysis were performed using the CellQuest software (Becton Dickinson). For ROS generation assessment, including superoxide anion and hydrogen peroxide, cells were incubated with 20.5- μ M DCFHDA (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 minutes in the dark and 5- μ M dihydrorhodamine (DHRH) 123 at 37°C for 30 minutes (Sigma-Aldrich). The cells were washed, resuspended in PBS, and then analyzed on a dual-laser FACSCalibur. As internal control, the fluorescence of unstained cells was used. To test the positivity of the RA population, monocytes and neutrophils isolated from healthy donors were used.

NETs induction and quantification. Isolated neutrophils from RA patients at baseline and after 6 months of TCZ treatment were seeded in 24-well plates on poly-L-lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences, San Jose, Calif) in tissue-culture wells and allowed to settle for 1 hour at 37°C under 5% CO₂. Then, cells were treated with or without phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, the most potent agent to induce NET formation) (600 nM) (Sigma-Aldrich) for 2 hours. Neutrophils purified from 5 RA patients with moderate-high DAS28, and not taking any biologic treatment, were treated *in vitro* with FCRII blocking (Miltenyi Biotec) for 15 minutes. Then, cells were washed with 1 mL of PBS and centrifuged at 300 g for 10 minutes. Thereafter, cells were seeded in the same way as described above and

pretreated with or without TCZ (20 μ g ml⁻¹) for 30 minutes and then incubated with IL-6 (100 ngml⁻¹) during 15 hours or PMA (600 nM) for 2 hours. After different treatments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and rinsed 3 times with PBS. DNA was stained with 5 mM SYTOX orange dye (Life technologies, Netherlands) and NETs were visualized using a Nikon Eclipse-Ti-S fluorescence microscope, (NIS-Elements imaging software). A total of 5 images selected randomly from different regions of each coverslip per case were taken with a 20 \times objective. NETs were manually identified on digitalized images as SYTOX-positive structures emanating from cells with overall length greater than 2 \times cell diameter from cells untreated^{26,27} and were counted for at least 3 fields using ImageJ software (NIH, Bethesda, Md). Results were expressed as percentage of NETs (NETs formation).

Detection of cell-free nucleosomes. Nucleosomes were measured by using the Human Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) following the manufacturer's recommendations. Monoclonal antibodies against DNA (double and single strand) and histones (H1, H2A, H2B, H3, and H4) were used to detect mono- and oligonucleosomes in serum from RA patients. Quantification of nucleosomes was performed by photometrical determination of the absorbance at 405 nm using as reference wavelength 492 nm.

Identification of low-density granulocytes (LDGs). Peripheral mononuclear blood cells (PMBCs) (5×10^5) were incubated with PE anti-human CD14 and FITC anti-human CD15 (BioLegend) for 30 minutes at 4°C in the dark. PE and FITC IgG isotypes from the same company were used as negative controls. Cells were washed, resuspended on 500 μ L of PBS and acquired on the flow cytometer FACSCalibur.

Neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO) protein expression. Whole peripheral blood (100 μ L) was incubated with 1 mL of lysis buffer (BD Pharm Lyse Lysing Buffer) for 10 minutes at room temperature in the dark. After centrifugation at 1800 rpm for 5 minutes at 4°C, cells were fixed and permeabilized with 250 μ L of buffer (BDCytofix/CytopermFixation/Permeabilization solution Kit with BD GolgiPlug) for 20 minutes at 4°C. Then, cells were incubated either with FITC anti-human MPO (BD Biosciences) or with anti-human NE primary antibody (RbmAb) (Abcam, Cambridge, UK). Then, for NE analysis, Alexa Fluor conjugated secondary antibody (Abcam) was added for 30 minutes at 4°C. IgG isotypes were used as negative controls. Cells were washed and acquired on the flow cytometer FACSCalibur.

PathScan intracellular signaling protein array. 10 μ g of total protein in 75 μ L were subjected to PathScan intracellular signaling array following the manufacture's

Table 1. Clinical details of the rheumatoid arthritis patients at baseline and after TCZ treatment

Parameters	RA patients		P value
	Baseline	TCZ	
Clinical parameters			
Female/Male (n/n)	16/4		
Age (years)	47.8 ± 2.30		
Duration of the disease (years)	7.6 ± 1.76		
RF levels	90.84 ± 25.22	54.22 ± 13.99	0.041
Anti-CCPs levels	761.09 ± 240.19	762.54 ± 251.44	0.991
Obesity (%)	6.10%		
Diabetes (%)	1%		
Hypertension (%)	2%		
Menopause (%)	50%		
Smoker (%)	25.0%		
Joint damage			
Swollen joints (n)	6.14 ± 1.01	0.71 ± 0.47	0.001
Tender joints (n)	19.00 ± 4.58	8.00 ± 2.93	0.045
DAS28	4.25 ± 0.18	2.90 ± 0.42	0.021
VAS	71.5 ± 3.94	48.33 ± 3.34	0.001
HAQ	1.54 ± 0.31	1.04 ± 0.33	0.046
Lipid profile			
Total Cholesterol, mg dl ⁻¹	180.00 ± 9.33	201.20 ± 7.39	0.070
HDL-Cholesterol, mg dl ⁻¹	45.60 ± 2.51	56.10 ± 2.42	0.001
LDL-Cholesterol, mg dl ⁻¹	115.30 ± 8.83	124.30 ± 9.30	0.319
Triglycerides, mg dl ⁻¹	94.00 ± 8.70	102.6 ± 9.57	0.273
Apolipoprotein A1	130.80 ± 5.68	151.90 ± 7.31	0.042
Apolipoprotein B	73.60 ± 4.44	79.90 ± 6.14	0.264
ApoB/ApoA1 ratio	0.57 ± 0.051	0.52 ± 0.035	0.267
Inflammatory parameters			
ESR, mm h ⁻¹	25.40 ± 6.09	4.22 ± 0.70	0.014
CRP, mg dl ⁻¹	13.29 ± 6.08	0.46 ± 0.18	0.045
Treatments			
Corticosteroids	62.5%	62.5%	
Hydroxychloroquine	12.5%	12.5%	
NSAIDs	75.0%	75.0%	
Methotrexate	63.5%	63.5%	
Leflunomide	30.0%	30.0%	
Vitamin D	18.0%	18.0%	

Abbreviations: HDL, high density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; DAS, disease activity score; anti-CCPs, anticyclic citrullinated proteins; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; RF, rheumatoid factor.

recommendations (Cell Signaling Technology, Mass). The phosphorylation levels of ERK1/2, STAT1, STAT3, AKT, AMPKa, S6 ribosomal protein, mTOR, HSP27, Bad, P70 S6 Kinase, PRAS40, p53, p38, SAPK/JNK, and GSK-3b and the cleavage of Caspase-3 and PARP were analyzed on monocytes isolated from RA patients at baseline and after 6 months of treatment with TCZ.

Plasma levels of cellular adhesion molecules. E-selectin and VCAM-1 levels were analyzed in plasma from RA patients before and after TCZ therapy using ProcartaPlex multiplex immunoassay, following the manufacturer's recommendations (Affymetrix eBioscience, Vienna, Austria).

Statistical analysis. All data are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed using the statistical software package SPSS (version 17.0 for

Windows; SPSS Iberica, Madrid, Spain). Following normality and equality of variance tests, comparisons were made by a parametric test (paired Student's t test) or alternatively by using a nonparametric test (Mann-Whitney rank sum test). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

TCZ improved the disease activity, clinical parameters, and ED in RA patients. Treatment of RA patients with TCZ (162 mg per week) for 6 months significantly reduced the number of both the swollen and tender joints. Moreover, there was a global improvement of the disease evidenced by a decrease in the VAS and a reduction in DAS28 from high disease activity to low-moderate disease activity: mean DAS28 changes

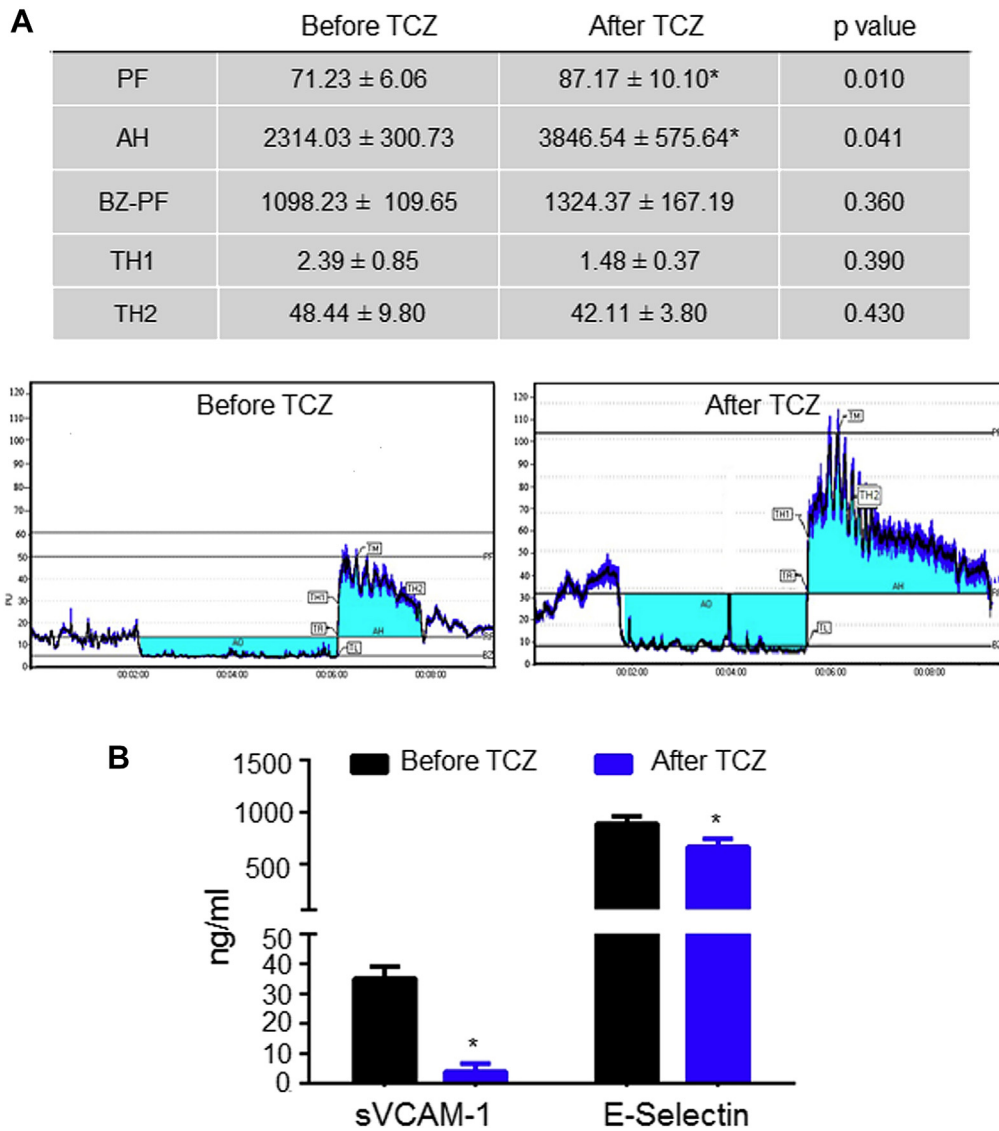


Fig 1. (A) Microvascular function was measured by Laser Doppler linear PeriFlux 5010 and was performed at baseline and after 6 months of tocilizumab (TCZ) treatment. Normal flow (NF), perfusion when occluded (BZ), occlusion area (AO), time to half before hyperemia (TH1), highest perfusion value after occlusion is released (PF), time to half after hyperemia (TH2), hyperemic area (AH), time to max (TM), time to recovery, time to latency. (B) E-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) levels were analyzed in plasma from rheumatoid arthritis (RA) patients before and after TCZ therapy by ProcartaPlex Multiplex immunoassay. Data are presented as mean ± SD (std deviation), n = 20 patients. (*) indicates significant differences vs before TCZ ($P < 0.05$).

(±SDs) were 1.35 ± 0.78 in TCZ-treated patients (Table I). Autoimmunity was further modulated by treatment *in vivo* with TCZ. Thus, a significant reduction of RF levels was observed. However, no effect was detected on the levels of anti-CCP antibodies. Regarding inflammatory clinical parameters, RA patients displayed significantly reduced levels of erythrocyte sedimentation rate and

C-reactive protein after therapy. TCZ also modulated the lipid profile in plasma, increasing the HDL-cholesterol and ApoA1 levels (Table I).

Endothelial function (measured by Laser Doppler measurement of post ischemic reactive hyperemia) improved notably, as shown by the augmentation of the highest perfusion value after occlusion was released (peak flow, PF) and by the increase of hyperemic area

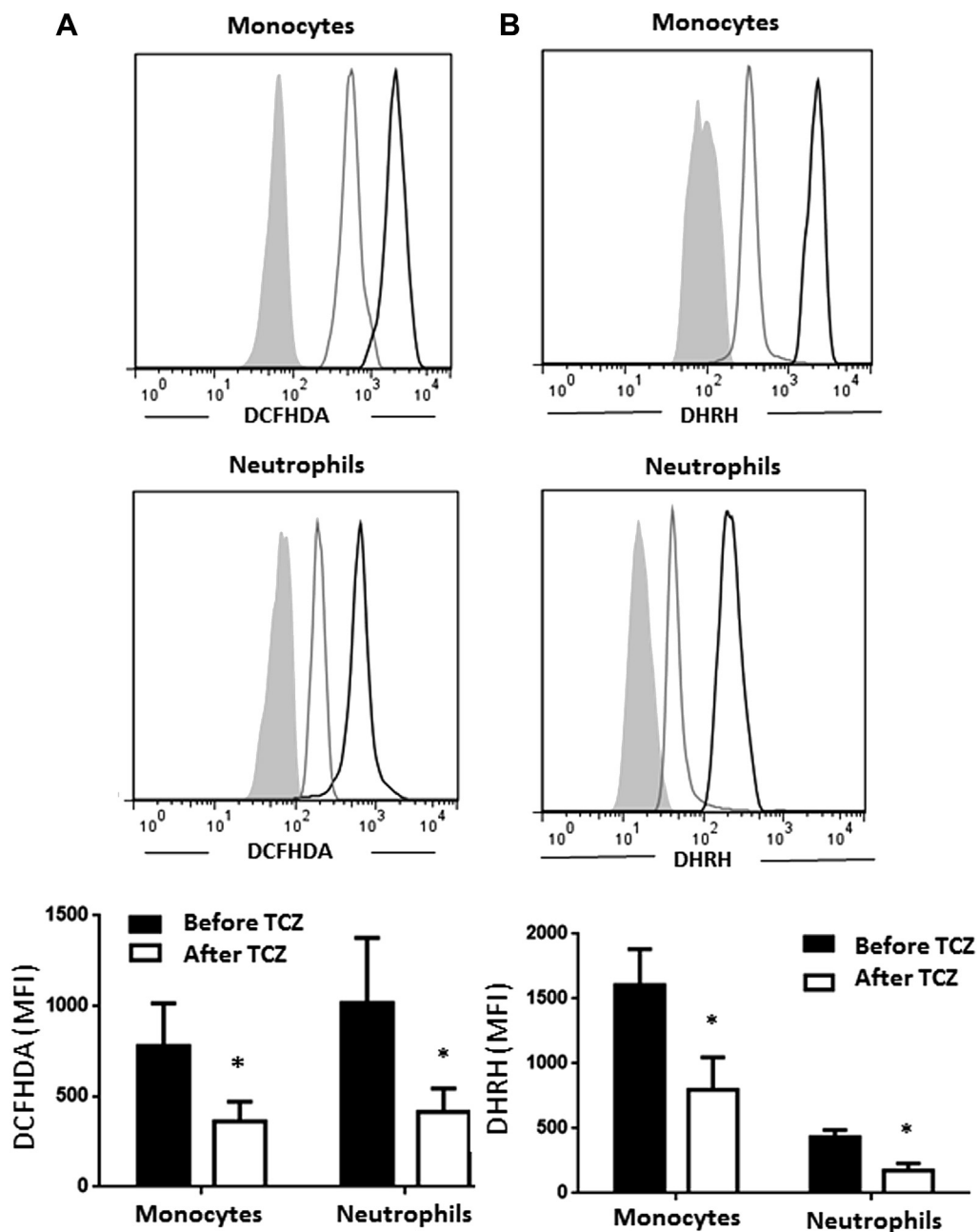


Fig 2. (A) Peroxides production in monocytes and neutrophils of rheumatoid arthritis (RA) patients at baseline and after 6 months of tocilizumab (TCZ) treatment were determined by addition of the fluorescent probe DCFHDA to the isolated cells and flow cytometry analysis. (B) Peroxides and peroxynitrites production in monocytes and neutrophils of RA patients before and after TCZ treatment were determined by the fluorescent probe DHRH-123 and flow cytometry analysis. Representative histograms with the mean fluorescence intensity of DCFHDA and DHRH in a healthy donor (full histogram), an RA patient before TCZ treatment (black unfilled histogram), and the same patient after TCZ therapy (gray unfilled histogram) (upper panel). Bar graphs show the mean \pm SD of mean fluorescence intensity (MFI), n = 20 patients. (*) indicates significant differences vs before TCZ ($P < 0.05$).

(HA) (Fig 1, A). In parallel, changes in plasma levels of parameters closely related to ED (cellular adhesion molecules such as E-selectin and VCAM-1) were found

significantly reduced by treatment with TCZ, thus supporting the improvement of the vascular function in these patients (Fig 1, B).

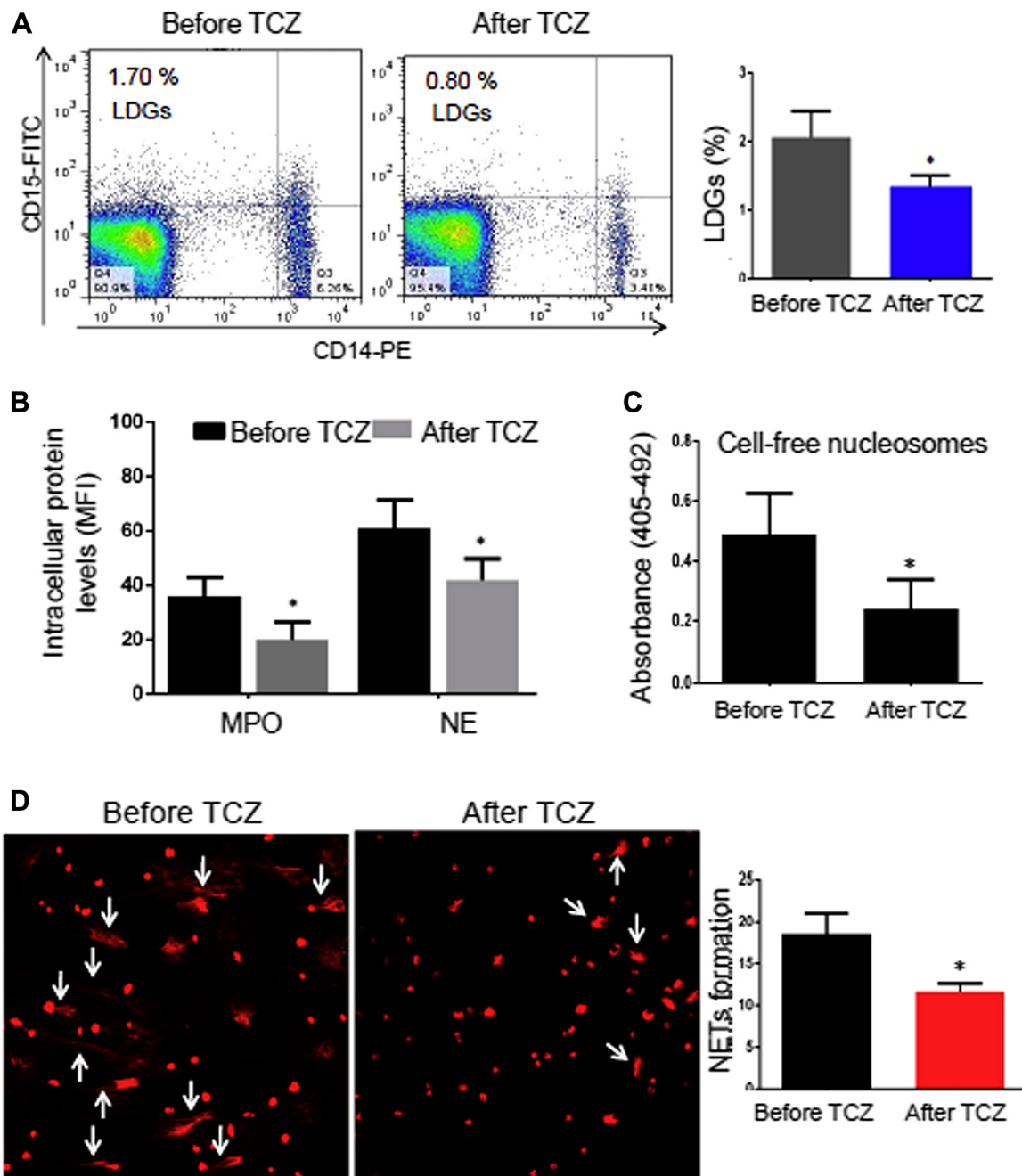


Fig 3. (A) Representative dot plots of low-density granulocytes from rheumatoid arthritis (RA) patients before and after tocilizumab (TCZ) treatment. (B) Intracellular MPO and NE protein expressions were measured in neutrophils from RA patients at baseline and after 6 months of TCZ treatment by flow cytometry. Bar graphs show the mean \pm SD of median fluorescence intensity (MFI). (C) Concentration of cell-free nucleosomes in serum by ELISA. (D) Representative images of neutrophil extracellular traps (NETs) from RA patients before and after TCZ treatment. NETosis was induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (600 nM) for 2 hours. DNA was stained with SYTOX orange dye and NETs were visualized by using a Nikon Eclipse-Ti-S fluorescence microscope 20 \times objective. Five images selected randomly from different regions of each coverslip per case were taken with a 20 \times objective. NETs were manually identified on digitalized images as SYTOX-positive structures emanating from cells with overall length greater than 2 \times cell diameter from cells without PMA. Arrowheads show the NET structures. NETs formation represents the average percentage of NETs structures from the 5 images taken in each condition. Bar graphs show the mean \pm SD, n = 20 patients (*) indicates significant differences vs before TCZ ($P < 0.05$).

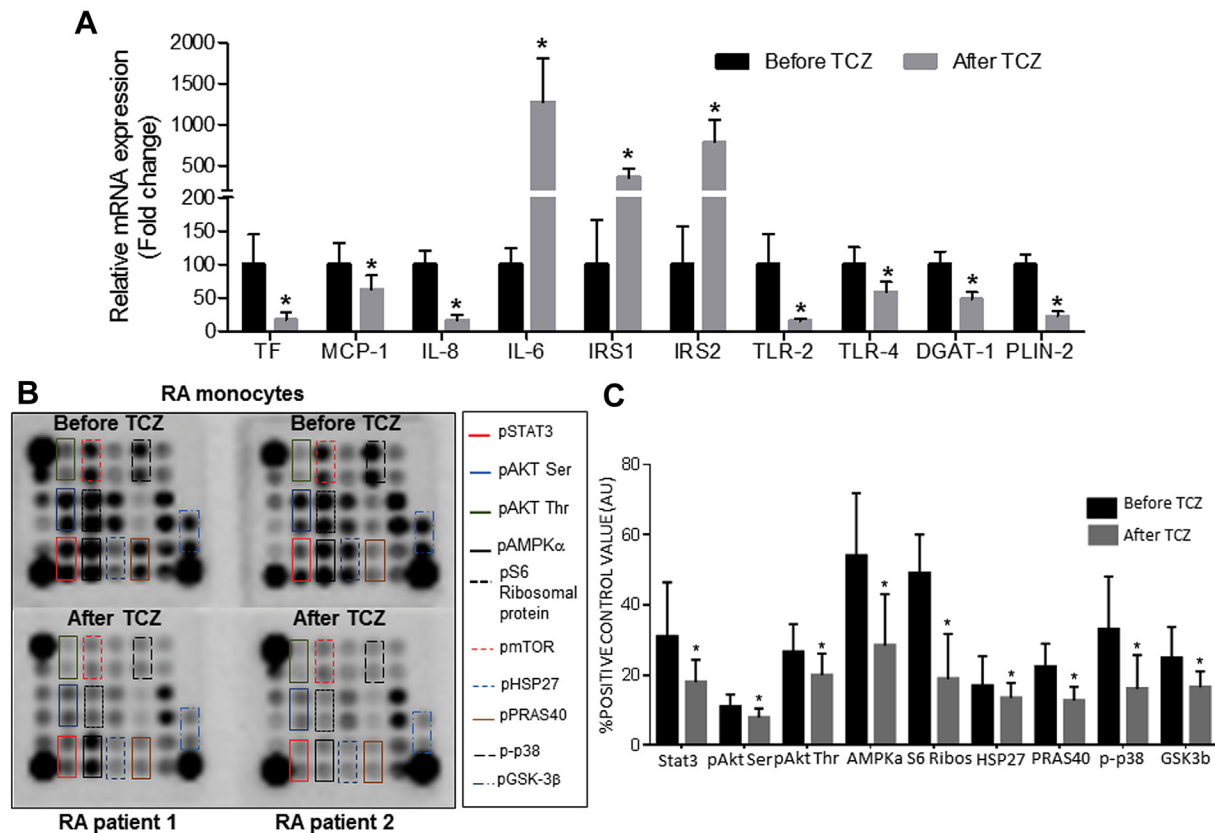


Fig 4. (A) Quantitative RT-PCR was performed on a panel of genes related to inflammation (MCP-1, IL-8, IL-6, TLR2 and TLR4), procoagulant activity (TF), lipid metabolism and storage (DGAT-1 and PLIN2), and insulin signal (IRS-1 and IRS-2) in rheumatoid arthritis (RA) monocytes at baseline and after 6 months of tocilizumab (TCZ) treatment. (B) Two representative panels of phosphorylation status of kinases using a PathScan intracellular signaling array in RA monocytes. (C) Quantification of volume intensity \times area (mm^2). Data are presented as mean \pm SD, $n = 20$ patients. (*) indicates significant differences vs before TCZ ($P < 0.05$). TF, tissue factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein; IL, interleukin; IRS, insulin signal; TLR, toll-like receptor; DGAT-1, diacylglycerol acyltransferase; PLIN2, adipophilin or ADRP; pSTAT3, phospho signal transducer and activator of transcription 3; pAKT, phospho protein kinase B or PKB; pAMPK α , phospho protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 or PRKAA1; pmTOR, phospho mechanistic target of rapamycin; pHSP27, phospho heat shock protein 27; pPRAS40, AKT1 substrate 1 or AKT1S1; p-p38, phospho mitogen-activated protein kinase 14; pGSK-3 β , phospho glycogen synthase kinase 3 beta.

TCZ reduced oxidative stress in leukocytes from RA patients. We have recently reported an increased oxidative status in leukocytes from RA patients, directly related to both the titers of anti-CCPs, and the expression of a number of inflammatory parameters, thus contributing to atherosclerosis.¹² Accordingly, peroxides and peroxynitrites levels were downregulated *in vivo* in monocytes and neutrophils from RA patients after 6 months of treatment with TCZ, showing a significant reduction in the mean fluorescence intensity of DHRH and DCFHDA in flow cytometry analyses (Fig 2, A and B).

TCZ therapy in RA patients downregulated the percentage of low-density granulocytes and decreased NETosis. A new subset of low-density granulocytes

(LDGs) have been identified in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) fraction of patients with various autoimmune diseases. These cells show a phenotypic profile based on CD14^{-dim} and CD15^{bright} expression, and are more prone to experience NETosis.²⁸ In the present study, a significant reduction in the percentage of LDGs in RA patients treated with TCZ was noticed (Fig 3, A).

Previous studies have shown that RA patients exhibit increased spontaneous NETs generation, associated with enhanced NE and MPO expression. In our hands, NE and MPO (main enzymes leading the initiation of NETosis) were found reduced in neutrophils from RA patients treated with TCZ (Fig 3, B).

In addition, neutrophils from RA patients treated with TCZ for 6 months displayed a reduced generation of NETs, so that the area of DNA fibers stained with SYTOX was significantly reduced by the effect of TCZ in RA neutrophils treated with PMA (Fig 3, D).

Moreover, supporting the reduction of NETosis generation by TCZ observed at cellular level, a decreased release of cell-free nucleosomes was detected in serum from RA patients after TCZ therapy (Fig 3, C).

In vivo treatment with TCZ reduced the procoagulant and inflammatory states and modulated insulin signaling in monocytes. Gene expression of molecules involved in inflammation (MCP-1, TLR4, and TLR2), procoagulant activity (TF), and migration (IL-8) was reduced in RA monocytes treated with TCZ (Fig 4, A). In contrast, *in vivo* inhibition of IL-6R signaling by TCZ increased the mRNA expression of IL-6 in monocytes from RA patients. The expression of genes related to insulin signaling, such as IRS-1 and IRS-2, was also found increased in monocytes from RA patients taking TCZ compared with baseline state. Molecules involved in lipid droplets formation (DGAT and PLIN2) were also found significantly reduced at mRNA level in monocytes from RA patients after 6 months of TCZ treatment (Fig 4, A).

TCZ modified the activation of several intracellular kinases on monocytes from RA patients. Dysfunctional intracellular signaling pathways play a critical role in RA, which might account for the immune-mediated chronic inflammation present in those autoimmune patients.²⁹ Using a protein array, we analyzed the changes promoted by TCZ treatment on the activation of 18 intracellular kinases in monocytes from RA patients. As expected, inhibition of IL-6R signaling by TCZ markedly reduced the phosphorylation of STAT3, a kinase directly activated by the binding of IL-6 to its receptor (Fig 4, B and C). Of note, the phosphorylation of 7 more protein kinases was found significantly downregulated by TCZ on RA monocytes, including AKT, AMPKa, S6 Ribosomal protein, p38, HSP27, PRAS40, and GSK3-b (Fig 4, B and C).

In vitro treatment of purified RA neutrophils and monocytes with TCZ reduced NETosis generation and improved the inflammatory and thrombotic profile of monocytes. To evaluate the specificity of the effect of TCZ, we conducted *in vitro* studies on monocytes and neutrophils.

In neutrophils isolated from RA patients, the pretreatment with IL-6 for 6 hours promoted a significant increase in NE and MPO intracellular levels that was prevented by addition of TCZ (Fig 5, A and B).

We further analyzed whether TCZ could diminish NETosis induced *in vitro*. The treatment of RA neutrophils with IL-6 or PMA induced an increase of NETosis

formation. The combination of TCZ plus IL-6 or PMA generated significantly less extrusion of DNA fibers in neutrophils compared with the treatment with IL-6 and PMA alone, suggesting that TCZ might prevent NETosis in RA patients (Fig 5, C).

In vitro treatment of monocytes isolated from RA patients with TCZ reduced their inflammatory and prothrombotic profile demonstrated by the decrease in the high expression of TLR2, TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, VEGF, VCAM, and ICAM observed in nontreated monocytes or induced by IL-6 (Fig 6, A).

TCZ significantly reduced the IL-6-induced expression of both adhesion molecules and inflammatory mediators in endothelial cells alone or cocultured with monocytes purified from RA patients. To mimic the *in vivo* effects of TCZ on the vessel wall, cultured HUVECs were treated with IL-6, either alone or in combination with TCZ. A significant increase in the mRNA expression of TLR2, IL-8, MCP-1, VEGF, and VCAM was noticed in HUVECs after treatment with IL-6 for 18 hours. Those high levels were downregulated by addition of TCZ, suggesting that IL-6R blockade might have a beneficial effect on the endothelial function (Fig 6, B).

On the other hand, by performing cocultures, we analyzed the interaction between endothelial cells and monocytes in the setting of RA. Coculture of RA monocytes with HUVECs increased the mRNA expression of TLR2, TNF- α , IL-1 β , IL-8, TF, MCP-1, ICAM, VCAM, and VEGF on endothelial cells. Moreover, these genes were significantly upregulated after the addition of IL-6 to the coculture medium (HUVECs with RA monocytes). Once more, TCZ significantly reduced the IL-6-induced expression of both adhesion molecules and inflammatory and prothrombotic mediators on endothelial cells cocultured with RA-purified monocytes (Fig 6, C), thus underlying the relevant role of this IL-6R-inhibitor on both, the improvement of endothelial function, and the decline of the monocytes-mediated proinflammatory profile associated to that autoimmune disorder.

DISCUSSION

The present study describes for the first time how TCZ might ameliorate the proatherothrombotic profile in RA, exploring the molecular changes related to inflammation, procoagulant properties and intracellular signaling in RA monocytes, the prevention of NETosis, and ED.

Recently published data showed that combination therapy with biologic DMARDs (bDMARDs) and synthetic DMARDs (sDMARDs) represents the best therapeutic option for the treatment of RA, since it can slow

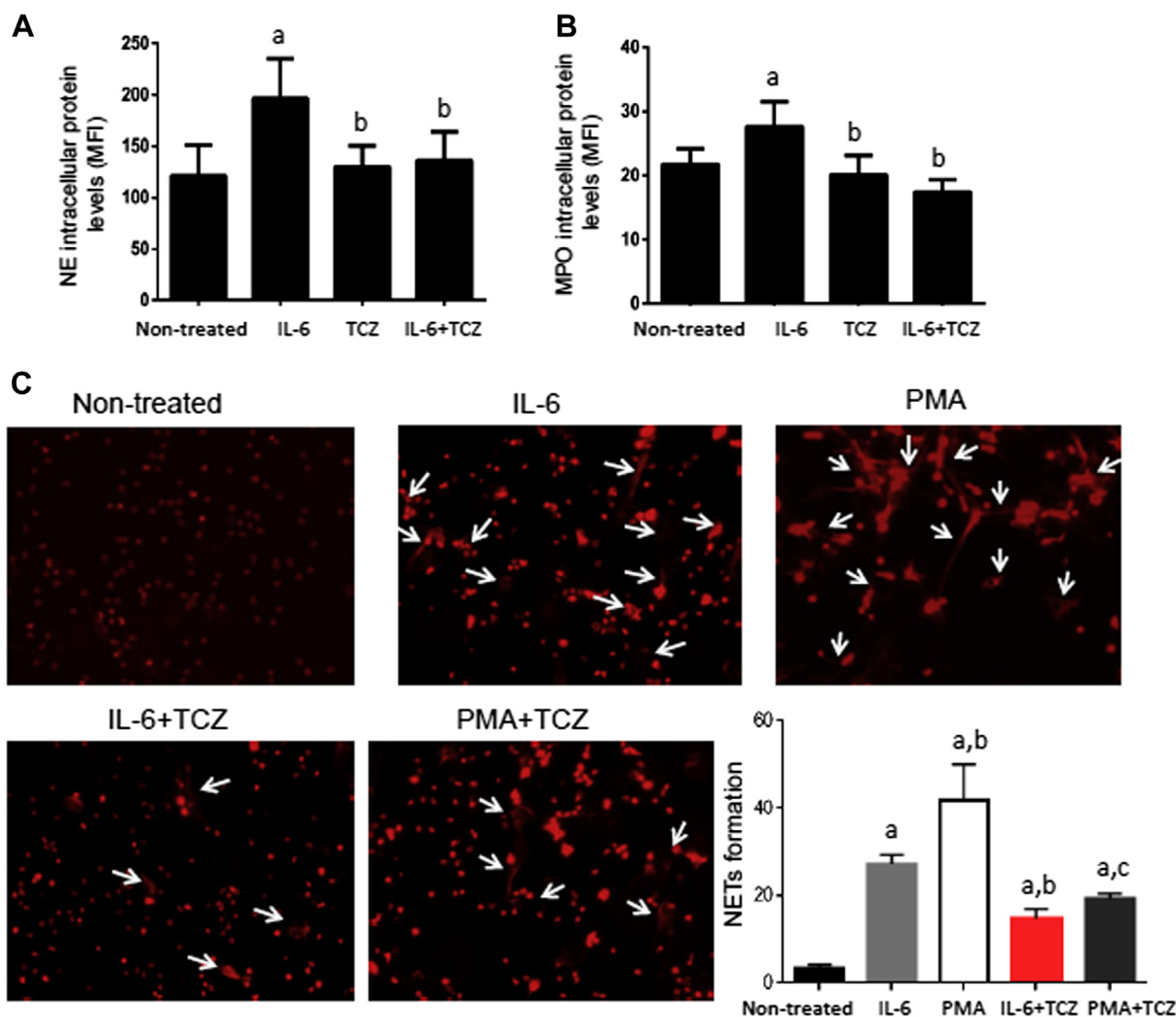


Fig 5. (A and B) Intracellular neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO) protein expression was measured in neutrophils isolated from 5 RA patients at baseline (not taking TCZ), nontreated, and treated *in vitro* with IL-6 (10 ng/mL), TCZ (20 μ g/mL) or IL-6 plus TCZ using flow cytometry. Bar graphs show the mean \pm SD of median fluorescence intensity (MFI) of 5 independent experiments. (a) indicates significant differences vs nontreated; (b) vs treated with IL-6 ($P < 0.05$). (C) Representative images of neutrophil extracellular traps (NETs) of neutrophils isolated from 5 RA patients at baseline (not taking TCZ), nontreated, and treated *in vitro* with IL-6 (100 ng/mL), TCZ, or IL-6 plus TCZ (20 μ g/mL) for 15 hours and also treated with phorhol-12-myristate-13-acetate (PMA) (600 nM) alone or combined with TCZ (20 μ g/mL) for 2 hours. DNA was stained with SYTOX orange dye and NETs were visualized by using a Nikon Eclipse-Ti-S fluorescence microscope 20 \times objective. Five images selected randomly from different regions of each coverslip per case were taken with a 20 \times objective. NETs were manually identified on digitalized images as SYTOX-positive structures emanating from cells with overall length greater than 2 \times cell diameter from untreated cells. Arrowheads show the NET structures. NETs formation represents the average percentage of NETs structures from the 5 images taken in each condition. Bar graphs show the mean \pm SD of percentage of NETs of 5 independent experiments, n = 5 different patients. (a) indicates significant differences vs nontreated; (b) vs treated with IL-6; (c) vs treated with PMA ($P < 0.05$).

the progression of the disabling structural damage.³⁰ In our cohort of patients, the combination of a bDMARD, TCZ, with sDMARDs (methotrexate, leflunomide, and hydroxychloroquine) globally improved the activity of the disease, with a DAS28 remission, evidenced by a decrease in the number of both tender and swollen

joints, clinical inflammatory parameters, and the assessment of the pain (VAS) after 6 months of treatment. Regarding autoimmunity, 6 months of treatment with TCZ induced a dramatic change in RF levels with no effect in anti-CCPs levels. A recent study by Iannone et al, which evaluated the effect of several bDMARDs on the

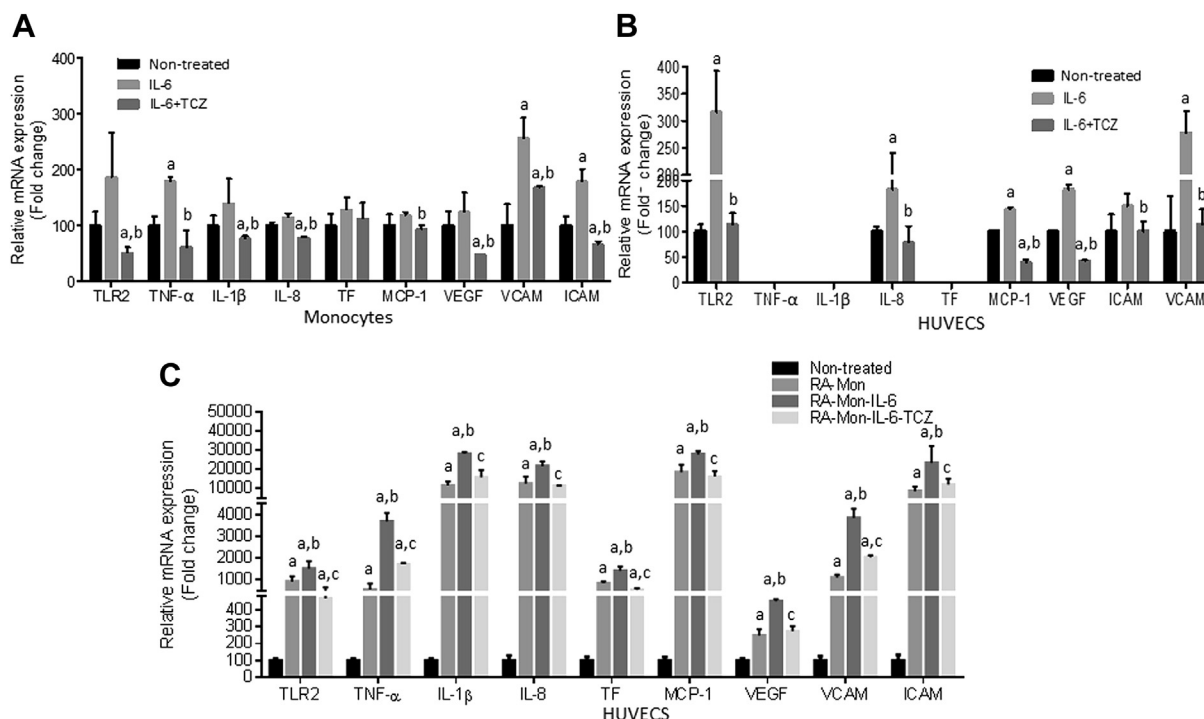


Fig 6. (A) Quantitative RT-PCR was performed on a panel of genes on monocytes purified from 5 RA patients at baseline (not taking TCZ), nontreated, and treated *in vitro* with IL-6 (10 ng/mL), TCZ, or IL-6 plus TCZ (20 μg/mL) for 18 hours. Bar graphs show the mean ± SD of 5 independent experiments, n = 5 different patients. (a) indicates significant differences vs nontreated monocytes; (b) vs monocytes treated with IL-6; ($P < 0.05$). (B) Quantitative RT-PCR was performed on a panel of genes on HUVEC cells treated with IL-6 (10 ng/mL) alone or in combination with TCZ (20 μg/mL). Bar graphs show the mean ± SD of 3 independent experiments. (a) indicates significant differences vs nontreated; (b) vs treated with IL-6 ($P < 0.05$). (C) Quantitative RT-PCR chain reaction was performed on a panel of genes on HUVEC cells cultured alone or cocultured with RA monocytes and treated with or without IL-6 (10 ng/mL) alone or in combination with TCZ (20 μg/mL). Bar graphs show the mean ± SD of 3 independent experiments. (a) indicates significant differences vs HUVEC cells cultured alone and nontreated; (b) vs cocultured with RA monocytes; (c) vs cocultured with RA monocytes treated with IL-6 ($P < 0.05$). TLR, toll-like receptor; TNFα, tumor necrosis factor α; IL, interleukin; TF, tissue factor; MCP-1, monocyte chemotactic protein; VEGF, vascular endothelial growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule-1; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

levels of RF and anti-CCPs, showed that 12 months of treatment with TCZ significantly reduced both RF and anti-CCPs serum levels in RA patients.³⁰ Thus, longer treatment with TCZ might be necessary to reduce the levels of anti-CCPs.

Recently, several studies evaluated the changes in the lipid profile associated with cardiovascular risk in patients with RA after TCZ therapy. In phase II and III trials, moderate alterations of LDLc, HDLc, and triglycerides were described. Thus, comparing with naïve-biologic therapy and others bDMARDs (including adalimumab, rituximab, and tofacitinib), TCZ greatly increased the levels of HDLc, noticed after the first 6 weeks of treatment, which was translated into high levels of total cholesterol.³¹⁻³⁴ Some of these studies further reported an increase in LDLc and triglycerides. In our cohort of patients, there was a significant

increase in fasting HDLc levels after 6 months of TCZ treatment; however, this was not related to a significant augmentation of the total cholesterol levels, which might be due to the unchanged levels of triglycerides and LDLc. Accordingly, ApoA1 levels were significantly augmented by treatment with TCZ.

The effect of TCZ on ED has been minimally explored. Protogerou et al., studied the flow-mediated dilatation and aortic stiffness in 16 patients treated with TCZ for 3 and 6 months. They reported an improvement of ED showed by a decrease in carotid to femoral pulse wave velocity and an augmentation of flow-mediated dilatation.¹⁹ In addition, comparison of TCZ monotherapy with other bDMARDs (etanercept and adalimumab) showed that all these bDMARDs decreased the arterial stiffness to a similar extent after 6 months of treatment.³⁵ In accordance, our study shows

a significant improvement of the microvascular function, with an increase in the peak flow after postocclusive reactive hyperemia. Of notice, we give new evidence about the efficacy of TCZ reducing ED in combined therapy with sDMARDs. Moreover, levels of CAMs, such as VCAM and e-Selectin were diminished in plasma of RA patients after treatment with TCZ. Elevated levels of these molecules have been shown to be associated with an increased risk for CVD. Thus, these results evidence the positive effects of TCZ on ED, which might be considered in the prevention of cardiovascular events. In agreement, a recent study showed a decrease in serum VEGF levels after 6 months of TCZ monotherapy.³⁶ Our results were further supported by *in vitro* studies on which treatment of ECs with TCZ prevented the induced expression of TLR2, IL-8, MCP-1, VEGF, ICAM, and VCAM by IL-6. Moreover, we could demonstrate that addition of TCZ to the coculture of RA monocytes with ECs plus IL-6 reduced the inflammatory profile (represented by a reduction of TNF α , IL1 β , IL-8, MCP-1, and TLR2 expression), and improved the ED, (through a downregulation of VEGF, ICAM, and VCAM). In the same way, Suzuki et al., described the important role of IL-6 increasing the rate of cell migration, and how TCZ was able to reduce the adhesion of monocytic cells (U937) to HUVEC.³⁷ All in all, our study supports the efficacy of TCZ in restoring the endothelial function and inhibiting the inflammation and cell adhesion in the context of RA.

Alteration in oxidative status has been closely related to CVD. Our group recently reported an altered oxidative status in leukocytes and plasma from RA patients.¹² The present study shows for the first time the effects of the inhibition of IL-6R signaling in the reduction of oxidative stress in monocytes and neutrophils of RA patients. *In vivo* treatment with TCZ significantly reduced the levels of peroxynitrites in both cell types. Other bDMARDs, such as etanercept and infliximab have been shown to decrease oxidative stress in serum and urine from patients with RA.^{38,39} Yet, only a recent study has evidenced that TCZ is more efficient in lowering the serum levels of oxidative stress markers in comparison with sDMARDs and anti-TNF α therapy.⁴⁰ Alongside this article, our study shows the great efficacy of TCZ in reducing oxidative status, not only at plasma levels, but also in RA monocytes and neutrophils, thus preventing vascular damage in patients with RA.

Monocytes from RA patients display a proatherothrombotic profile, showing elevated expression of proinflammatory cytokines and procoagulant factors.¹² The effect of TCZ on the atherothrombotic markers associated with RA at plasma level has already been

described. Thus, TCZ reduced prothrombotic molecules including D-dimer, prothrombotic fragment 1 + 1, fibrinogen, lipoprotein A, and phospholipase A2 IIA in plasma from RA patients.^{32,41,42} However, there is little evidence about the effect of TCZ on RA monocytes; only few studies described that TCZ induced apoptosis on monocytes from RA patients.⁴³ We here analyzed in depth the molecular changes that occurred on monocytes from RA patients treated with TCZ. A marked reduction of the inflammatory profile, prothrombotic properties, and migratory capacity was observed at mRNA levels on RA monocytes, showed by the downregulation of TLR2, TNF α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, VEGF, VCAM, and ICAM.

By contrast, a significant increase of IL-6 mRNA levels was noticed on monocytes from RA patients taking TCZ for 6 months. Our results are in line with Nishimoto et al., who recently described that circulating levels of IL-6 and sIL-6R increased after TCZ administration in RA patients.⁴⁴ They argued that this effect was probably due to a reduction of their elimination after formation of TCZ/sIL-6R immune complexes. In the same way, the increased levels of IL-6 mRNA in our study might derive from that feedback process.

In addition, we here provide new evidences about the effect of TCZ on the formation of lipid droplets on RA monocytes. The accumulation of lipid droplets within leukocytes on inflammatory conditions has been documented.⁴⁵ In this context, lipid droplets compartmentalize several proteins and lipids involved in the control of biosynthesis and secretion of inflammatory molecules, including leukotriene and PGE2.⁴⁶ PLIN and DGAT are two genes involved in lipid droplets regulation. PLIN2 overexpression results in increased formation of lipid droplets.⁴⁶ In turn, growth of lipid droplets is linked to functions performed by endoplasmic reticulum mediated by endoplasmic reticulum proteins such as DGAT. We found a significant reduction in the expression of these genes on RA monocytes treated *in vivo* with TCZ, which might suggest that TCZ reduced the formation of lipid droplets, inhibiting the inflammation mediated by immune cells. Nevertheless, a deeper research is needed to delineate the effect of TCZ in the lipid metabolism and storage within the immune cells.

The cellular responses observed in monocytes, related to cytokine and thrombotic factors production, lipid metabolism, and storage and insulin signaling depend on the activation of specific signaling pathways. Proteins from the synovial tissue of RA patients have been reported to be extensively phosphorylated by intracellular tyrosine kinases, supporting the importance of tyrosine kinases in the pathogenesis of RA.⁴⁷ Yet, this is the first article describing a downregulation of the main signaling pathways associated with RA

pathogenesis in monocytes by TCZ: JAK/STAT, SAPK/MAPK, and PI3K/AKT/mTOR. Although a number of studies have analyzed the role of specific intracellular pathways on the response to bDMARDs/sDMARDs, the use of an array to identify a wide spectrum of cell signaling molecules constitutes a valuable tool to better delineate the regulatory mechanisms modulated at cellular level by effects of specific drugs.

Neutrophils have recently been recognized as essential actors in the development of the atherosclerotic plaque. Neutrophils from RA patients are more susceptible to experience spontaneous NETosis.⁴⁸ The effects of IL-6 on neutrophil functions remain poorly understood, with conflicting evidence reporting that IL-6 can either delay, accelerate, or have no effect on neutrophil apoptosis.⁴⁹⁻⁵¹ In our hands, the relevance of neutrophils function in CVD and their regulation by TCZ have been exposed by a decrease in the NETosis generation induced either by IL-6 or PMA, determinant in atherosclerosis development. This data suggests that TCZ improves the overall state of neutrophils so that they can be less prone to experience *in vitro* induced NETosis.

LDGs in RA are functionally different from RA neutrophils, having enhanced netting capabilities²⁸ and survival properties and decreased TNF signaling which might contribute to the disease pathology and response to therapy.⁵² Moreover, LDGs display an activated phenotype, inducing endothelial cell cytotoxicity and thus playing a relevant role in cardiovascular development.⁵³ Our results show the beneficial effect of TCZ decreasing the percentage of LDGs in RA patients which might reduce the vascular damage induced by these subtypes of neutrophils.

Although further studies are required, our results indicate that neutrophils might have an important role in the development of inflammation in the context of RA, and that IL-6R signaling blockade could be a useful therapy to avoid undesired effects of persistent neutrophil activation.

This is the first study that evaluates the direct effect of TCZ on monocytes and neutrophils from RA patients. By performing *in vitro* studies, adding TCZ to monocytes and neutrophils isolated from RA patients that were not taking TCZ, the specificity of the effects of this biologic therapy on each cell type and each parameter analyzed was confirmed, something that should be considered a relevant point since patients were taking other therapies that could also influence the effects attributed to TCZ.

Our overall data suggest that TCZ improves the proatherothrombotic status of RA patients by simultaneously regulating the dyslipidemia, the ED, and the inflammatory activity of monocytes and neutrophils

through mechanisms involving modulation of oxidative stress, NETosis, and intracellular signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

Conflicts of Interest: All the authors have read the journal's authorship agreement. All authors have read the journal's policy on disclosure of potential conflicts of interest and E. Collantes-Estevez has received research grants, consulting fees, and speaker's fees from AbbVie, BMS, Janssen, MSD, Pfizer, and UCB.

This work was supported by grants from the 'Junta de Andalucía' (CTS-7940, PI-0191-2013), the Spanish Rheumatology Foundation (FER), the Instituto de Salud Carlos III (PI15/01333 and CP15/00158, and RIER RD16/0012/0015), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (co-financed by FEDER, European Union "Una manera de hacer Europa"). C. López-Pedrerá was supported by a contract from the Spanish Junta de Andalucía. N. Barbarroja was supported by a Ministry of Health postdoctoral fellowship (Miguel Servet Program).

We thank all the patients for their kind participation in this study. We also thank Roche Farma, S.A for its collaboration.

REFERENCES

1. del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44:2737-45.
2. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 2005;52:402-11.
3. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrua C, Gonzalez-Gay MA. Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:407-13.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
5. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23:222-31.
6. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R101.
7. Steyers CM 3rd, Miller FJ Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2014;15:11324-49.
8. 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.
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.

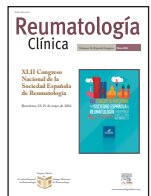
10. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* 2007;379:pe11.
11. Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front Immunol* 2012;3:428.
12. Barbarroja N, Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, et al. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2706–16.
13. Gratchev A, Sobenin I, Orekhov A, Kzyshkowska J. Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology* 2012;217:476–82.
14. Orme J, Mohan CH. Macrophages and neutrophils in systemic lupus erythematosus—an online molecular catalog. *Autoimmun Rev* 2012;11:365–72.
15. Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* 1996;106:13–9.
16. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007;9:224.
17. Goronzy JJ, Weyand CM. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;1:249.
18. Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Res Ther* 2009;11:S1.
19. Protogerou AD, Zampeli E, Fragiadaki K, Stamatelopoulou K, Papamichael C, Sfikakisa PP. A pilot study of endothelial dysfunction and aortic stiffness after interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2011;219:734–6.
20. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51 Suppl 5:v3–11.
21. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, et al. Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction. *Immunity* 2008;29:628–36.
22. Samson M, Audia S, Janikashvili N, et al. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2499–503.
23. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol* 2008;181:151–60.
24. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification criteria. An American College of Rheumatology/ European League against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81.
25. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8.
26. Farley K, Stolley JM, Zhao P, Cooley J, Remold-O'Donnell E. A SerpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting NETosis. *J Immunol* 2012;189:4574–81.
27. Yan H, Zhou HF, Akk A, et al. Neutrophil proteases promote experimental abdominal aortic aneurysm via extracellular trap release and plasmacytoid dendritic cell activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1660–9.
28. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 2013;35:455–63.
29. Malemud CJ. Intracellular signaling pathways in rheumatoid arthritis. *J Clin Cell Immunol* 2013;4:160.
30. Iannone F, Lopalco G, Cantarini L, Galeazzi M, Lapadula G. Efficacy and safety of combination therapy for preventing bone damage in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2016;35:19–23.
31. Strang AC, Bisioendial RJ, Kootte RS, et al. Pro-atherogenic lipid changes and decreased hepatic LDL receptor expression by tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2013;229:174–81.
32. Gabay C, McInnes IB, Kavanaugh A, et al. Comparison of lipid and lipid-associated cardiovascular risk marker changes after treatment with tocilizumab or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016;75:1806–12.
33. Provan SA, Berg IJ, Hammer HB, Mathiessen A, Kvien TK, Semb AG. The impact of newer biological disease modifying anti-rheumatic drugs on cardiovascular risk factors: a 12-month longitudinal study in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab, abatacept and tociliziumab. *PLoS One* 2015;10:e0130709.
34. Souto A, Salgado E, Maneiro JR, Mera A, Carmona L, Gómez-Reino JJ. Lipid profile changes in patients with chronic inflammatory arthritis treated with biologic agents and tofacitinib in randomized clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:117–27.
35. Kume K, Amano K, Yamada S, Hatta K, Ohta H, Kuwaba N. Tocilizumab monotherapy reduces arterial stiffness as effectively as etanercept or adalimumab monotherapy in rheumatoid arthritis: an open-label randomized controlled trial. *J Rheumatol* 2011;38:2169–71.
36. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol* 2009;19:12–9.
37. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Mihara M. Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule. *Rheumatol Int* 2010;30:309–15.
38. Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF α antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:73–80.
39. Kageyama Y, Takahashi M, Nagafusa T, Torikai E, Nagano A. Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008;28:245–51.
40. 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;32:4041–5.
41. Gualtierotti R, Ingegnoli F, Griffini S, Grovetti E, Meroni PL, Cugno M. Prothrombotic biomarkers in patients with rheumatoid arthritis: the beneficial effect of IL-6 receptor blockade. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34:451–8.
42. McInnes IB, Thompson L, Giles JT, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on surrogates of vascular risk in rheumatoid arthritis: MEASURE, a randomised, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis* 2015;74:694–702.
43. Tono T, Aihara S, Hoshiyama T, Arinuma Y, Nagai T, Hirohata S. Effects of anti-IL-6 receptor antibody on human monocytes. *Mod Rheumatol* 2015;25:79–84.
44. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration

- of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008;112:3959–64.
45. Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies-biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:540–51.
 46. Herker E, Ott M. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem* 2012;287:2280–7.
 47. Okamoto H, Kobayashi A. Tyrosine kinases in rheumatoid arthritis. *J Inflamm (Lond)* 2011;8:21.
 48. Chowdhury CS, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R122.
 49. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol* 1995;58:5824.
 50. Afford SC, Pongracz 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; 267:216126.
 51. McNamee JP, Bellier PV, Kutzner BC, Wilkins RC. Effect of pro-inflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture. *Cytokine* 2005;31:1617.
 52. Wright HL, Makki FA, Moots RJ, Edwards SW. Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signaling. *J Leukoc Biol* 2016. pii: jlb.5A0116–022R. [Epub ahead of print].
 53. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induced vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 2010;184:3284–97.



Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



PÓSTERS EXHIBIDOS

XLII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología

Barcelona, 18-21 de mayo de 2016

1.ª Sesión

Jueves, 19 de mayo

1. MODELOS DE ATENCIÓN MULTIDISCIPLINAR EN PACIENTES CON ARTRITIS PSORIÁSICA EN ESPAÑA

R. Queiro¹, P. Coto², J. Rodríguez³, J. Notario⁴, T. Navío Marco⁵, P. de la Cueva⁶, M. Pujol Busquets⁷, M. García Font⁸, B. Joven⁹, R. Rivera¹⁰, J.L. Álvarez Vega¹¹, A.J. Chaves Álvarez¹², R. Sánchez Parera¹³, J.C. Ruiz Carrascosa¹⁴, F.J. Rodríguez Martínez¹⁵, J. Pardo Sánchez¹⁶, C. Feced Olmos¹⁷, C. Pujol¹⁸, E. Galíndez¹⁹, S. Pérez Barrio²⁰, A. Urruticoechea-Arana²¹, M. Hergueta²², J. Luelmo²³ y J. Gratacós²⁴

¹Servicio de Reumatología; ²Servicio de Dermatología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. ³Servicio de Reumatología; ⁴Servicio de Dermatología. Hospital Universitari de Bellvitge. Barcelona. ⁵Servicio de Reumatología; ⁶Servicio de Dermatología. Hospital Universitario Infanta Leonor. Madrid. ⁷Servicio de Reumatología; ⁸Servicio de Dermatología. Hospital Mutua de Terrassa. Barcelona. ⁹Servicio de Reumatología; ¹⁰Servicio de Dermatología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. ¹¹Servicio de Reumatología; ¹²Servicio de Dermatología. Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina. Badajoz. ¹³Servicio de Reumatología; ¹⁴Servicio de Dermatología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. ¹⁵Servicio de Reumatología; ¹⁶Servicio de Dermatología. Hospital General Universitario Santa Lucía. Cartagena. Murcia. ¹⁷Servicio de Reumatología; ¹⁸Servicio de Dermatología. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia. ¹⁹Servicio de Reumatología; ²⁰Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de Basurto. Bizkaia. ²¹Servicio de Reumatología; ²²Servicio de Dermatología. Hospital Can Misses. Ibiza. ²³Servicio de Dermatología; ²⁴Servicio de Reumatología. Corporació Sanitària Parc Taulí. Sabadell.

Objetivos: Describir (estructura, procesos) los modelos de atención multidisciplinar de pacientes con artritis psoriásica (APs) en España así como las barreras y facilitadores en su implantación.

Métodos: Se realizó un estudio cualitativo mediante entrevistas estructuradas a 24 profesionales (12 reumatólogos, 12 dermatólogos que realizan atención multidisciplinar en pacientes con APs). Se recogieron datos relacionados con el centro, servicio, población atendida y sobre el modelo de atención multidisciplinar (tipo, recursos materiales y humanos, requerimientos de los profesionales, objetivos, criterios de entrada y salida, agendas, protocolos de actuación, responsabilidades, toma de decisiones, actividad

Pasos generales a seguir en la implantación de un modelo de atención multidisciplinar para pacientes con artritis psoriásica (APs)

Pasos pre-implantación

1. Buscar 2 especialistas implicados, con experiencia, interés, y buena sintonía
2. Comunicación entre jefes/responsables del servicio para dar el visto bueno
3. Si fuese necesario presentar la propuesta a la gerencia/dirección médica
4. Definir de forma conjunta:
 - Tipo de modelo que mejor se puede ajustar a las circunstancias del centro/profesionales
 - Criterios de entrada y salida de pacientes
 - Cadencia de visitas y nº pacientes/visita (modelos conjuntos)
 - Cómo, qué días, se pueden comunicar por teléfono, correo, en persona, etc.
 - Lugar/es donde se realizará la consulta multidisciplinar (modelos conjuntos)
 - Materiales necesarios (ordenador, sillas...)
 - Si procede: protocolos, guías a seguir
 - Nivel de responsabilidad/implicación en el seguimiento y tratamiento de pacientes:
 - Definir si se van a recomendar o directamente cambiar tratamientos
 - En el caso de que se decida indicar una terapia biológica establecer un criterio sobre a quién le va a computar esta prescripción
 - Plan de objetivos
 - Registro y evaluación de la actividad (qué, quién, dónde, etc.)
 - Medidas (actividad de la consulta, actividad y daño de la APs, calidad de vida, etc.)
5. Preparar la logística de las agendas
 - Intentar generar una agenda única cuya actividad compute a ambos servicios
6. Presentar el proyecto a los 2 servicios

PASOS DURANTE LA IMPLANTACIÓN (2 primeros años)

7. Buscar fórmulas eficientes para agilizar la consulta/s
8. Dar un informe para el paciente y su médico responsable (pueden ser 2 diferentes)
9. Evaluar la consulta multidisciplinar y realizar ajustes:
 - Al empezar evaluarla cada 3-6 meses y hacer los ajustes que se precisen:
 - Sobre la agenda, cambios en la cadencia y/o nº de pacientes vistos por visita
 - Recordatorio a los servicios sobre el servicio y los criterios de derivación
 - Implicar, formar al personal de enfermería/auxiliar de enfermería
 - Definir más específicamente qué actitud a seguir en determinado tipo de pacientes
 - Necesidad de ajustes en la historia médica electrónica
 - En caso de recogida de datos, evaluar si lleva mucho tiempo, es factible, hay que modificar variables, reducir el número que se recogen, etc.
 - A final de año se realizará una evaluación de los objetivos concretos planteados

Pasos post-implantación (a partir de 2 años)

10. Evaluación de la consulta y objetivos
 - Recomendable hacerlo de forma anual/bianual
 - Se recogerá y analizará lo que no estén funcionando bien, incidencias, etc.
 - Si algún objetivo no se ha cumplido se evaluará por qué
 - Con todo ello se diseñará un plan de mejora
11. Junto con el plan de mejora se podrán plantear nuevos objetivos. Además de objetivos clínicos se podrán valorar otros relacionados con la investigación y/o docencia
12. Una vez bien asentados se puede ver si la consulta cumple con los estándares de calidad desarrollados en el NEXUS
13. De igual manera se puede sopesar la implantación de los indicadores de calidad igualmente generados en el NEXUS

cional y cognitivo y consumen menos fármacos y psicofármacos que los pacientes con caídas frecuentes. Estas diferencias podrían determinar la mayor proporción de fracturas peritrocantéreas en los pacientes con caídas aisladas. No hay diferencias en cuanto a suplementación con calcio y vitamina D ni concentración sérica de calcidiol.

184. TCZ PREVIENE LA ATERTROMBOSIS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE MEDIANTE SU ACCIÓN DIRECTA SOBRE LA GENERACIÓN DE NETOSIS Y LA ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA MEDIADA POR LOS MONOCITOS

P. Ruiz-Limón, R. Ortega, C. Pérez-Sánchez, Y. Jiménez-Gómez, M. Ábalos-Aguilera, I. Arias de la Rosa, P. Font, M. Aguirre, J. Calvo, C. Castro, E. Collantes-Estévez, A. Escudero, N. Barbarroja y C. López-Pedraza

Servicio de Reumatología. IMIBIC/Hospital Reina Sofía. Universidad de Córdoba.

Introducción: La inhibición de la ruta del receptor de la IL-6 por tocilizumab (TCZ) representa una opción terapéutica efectiva en el tratamiento actual de la artritis reumatoide (AR). TCZ disminuye los marcadores de aterosclerosis y mejora la función endotelial. En sangre periférica, TCZ aumenta el porcentaje de células NK (natural killer) y T reguladoras y reduce el número de linfocitos inflamatorios Th1/Th17. La activación del monocito y la generación de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) juegan un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular; sin embargo, el efecto directo del TCZ sobre estas células todavía no se ha descrito.

Objetivos: Analizar los cambios moleculares y celulares en monocitos y neutrófilos que subyacen al efecto beneficioso del TCZ en la aterosclerosis y la disfunción endotelial en la AR.

Métodos: En este estudio se incluyeron 15 pacientes AR que recibieron 162 mg/semana de TCZ como terapia combinada y 5 pacientes AR con alta actividad de la enfermedad que no tomaban TCZ para realizar estudios in vitro. La función endotelial se analizó mediante la medida del flujo sanguíneo en respuesta a la hiperemia reactiva, utilizando un láser-Doppler. En estudios in vitro, monocitos y neutrófilos de pacientes AR se trataron con IL-6 y FCRII más TCZ durante 18 y 6 horas respectivamente. Se analizaron marcadores de estrés oxidativo en leucocitos por citometría de flujo. La generación de NETs fue cuantificada mediante la tinción con Sytox. La expresión proteica de mieloperoxidasa (MPO) y elastasa (NE) se analizó en neutrófilos por citometría de flujo. Los niveles de ARNm de peptidil arginina deiminasa (PADI4) se analizaron mediante RT-PCR. Se cuantificó el porcentaje de granulocitos de baja densidad (LDGs) mediante citometría de flujo. La expresión de ARNm de genes involucrados en la activación del monocito, estado protrombótico, captación de lípidos y resistencia a la insulina se analizó en monocitos mediante array. Asimismo, se evaluaron los niveles de determinados microRNAs en el plasma.

Resultados: Tras 6 meses de tratamiento, TCZ redujo parámetros clínicos de inflamación, autoinmunidad, y daño articular. La función endotelial mejoró significativamente. TCZ redujo los niveles de peróxidos y peroxinitritos en los leucocitos AR, más significativamente en monocitos y neutrófilos. El porcentaje de LDGs fue también reducido tras tratamiento in vivo con TCZ. El TCZ disminuyó significativamente la expresión de MPO, NE y PADI4 en neutrófilos AR. La generación de NETs fue también inhibida por TCZ. Asimismo, el tratamiento con TCZ alteró la expresión de moléculas protrombóticas e inflamatorias, genes involucrados en la captación de lípidos, activación celular y resistencia a la insulina y la activación de varias rutas intracelulares en monocitos. Por otra parte, el tratamiento in vivo con TCZ aumentó los niveles plasmáticos de los miRNA-223,

miRNA-146 y miRNA-23, previamente observados alterados en respuesta a otros fármacos biológicos como los anti-TNFa. El efecto específico de este fármaco se confirmó tras tratamientos in vitro de monocitos y neutrófilos AR con TCZ.

Conclusiones: TCZ mejora la función endotelial y el estado proarterotrombótico de pacientes AR mediante la reducción del estatus oxidativo, la inhibición del perfil protrombótico e inflamatorio del monocito y la generación de NETosis.

Financiado por CTS7940, PI2013-0191, CP15/00158, PI15/01333.

185. LA ARTRITIS REUMATOIDE Y EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO MUESTRAN UN GRADO SIMILAR DE SEVERIDAD DE ATERTOSCLEROSIS SUBCLÍNICA. ESTUDIO TRANSVERSAL EN UNA POBLACIÓN DEL NORTE DE ESPAÑA

L. Riancho-Zarrabeitia, A. Corrales, N. Vegas-Revenga, L. Domínguez-Casas, C. Fernández-Díaz, V. Portilla, R. Blanco y M.A. González-Gay

Servicio de Reumatología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. IDIVAL. Santander.

Introducción: La inflamación crónica juega un papel clave en el desarrollo de aterosclerosis especialmente en pacientes con enfermedades reumatológicas. Los pacientes con artritis reumatoide (AR) y con lupus eritematoso sistémico (LES) presentan con mayor frecuencia aterosclerosis y enfermedad cardiovascular que la población general.

Objetivos: Nuestro objetivo es establecer la frecuencia de aterosclerosis subclínica en pacientes con AR y LES y determinar si existen diferencias en la frecuencia de la misma entre estas dos patologías.

Métodos: Se evaluaron 99 pacientes con LES y 206 pacientes con AR sin eventos cardiovasculares previos ajustados por edad y sexo. La aterosclerosis subclínica se definió por la presencia de placa carotídea, de acuerdo con los criterios del consenso de Mannheim y/o por la presencia de espesor íntima-media carotídeo (EIM-c) mayor de 0,9 mm. La ecografía carotídea se realizó, con un ecógrafo MyLab 70 (Esaote; Genoa, Italia), equipado con una sonda lineal de 7-12 MHz y con un software automatizado de radiofrecuencia-Quality Intima Media Thickness in real-time (QIMT, Esaote, Maastricht, Holanda). Se realizó un análisis estadístico, utilizando un paquete informático, univariable y posteriormente multivariable mediante regresión logística y regresión lineal múltiple.

	Lupus eritematoso sistémico (n = 99)	Artritis reumatoide (n = 206)	p
Sexo femenino (%)	93,9	95,1	0,784
Edad (media ± DE)	51,4 ± 13,4	51,9 ± 13,5	0,768
Duración de enfermedad (media ± DE)	11,1 ± 8,5	8,6 ± 8,3	0,015
Hipertensión arterial (%)	25,3	31,9	0,284
Dislipemia (%)	19,2	42,2	< 0,001
Diabetes mellitus (%)	1	8,3	0,009
Hábito tabáquico (%)			0,084
Fumador activo/	24,2/	33,8/	
Exfumador	27,3	17,6	
Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular precoz (%)	29,6	19,2	0,055
Placas carotídeas (%)	44,4	40,2	0,535
Placas carotídeas (%) Unilaterales/	23,2/21,2	13,7/26,5	0,104
Bilaterales			
EIM-c patológico (%)	6,3	9,8	0,383

Resultados: Los pacientes con AR tenían una edad media de 51,9 ± 13,5 años, siendo 51,4 ± 13,4 años en los pacientes con LES (p = 0,768). La distribución de las características demográficas y los factores de riesgo cardiovascular clásicos se resume en la tabla. En cuanto a la presencia de placas carotídeas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El 40,2% de los pacientes con

[FRI0046] TCZ ATTENUATES ATHEROTHROMBOSIS THROUGH THE SPECIFIC INHIBITION OF NETOSIS AND MONOCYTE-MEDIATED PROINFLAMMATORY ACTIVITY

P. Ruiz-Limon, N. Barbarroja, R. Ortega, C. Perez-Sanchez, Y. Jimenez-Gomez, M.C. Abalos-Aguilera, I. Arias de la Rosa, P. Font, M.A. Aguirre, M.C. Castro, J. Calvo, E. Collantes-Estevez, A. Escudero, C. Lopez-Pedreira. Rheumatology service, IMIBIC/University of Cordoba/Reina Sofia Hospital, Cordoba, Spain

Background: Inhibition of the interleukin IL6 receptor pathway by tocilizumab (TCZ) is an effective treatment for rheumatoid arthritis (RA). TCZ reduces atherosclerosis markers and improves endothelial function. In peripheral blood, TCZ increases the percentage of natural killer and regulatory T cells and decreases the number of inflammatory Th1/Th17 lymphocytes. Monocytes activation and neutrophil extracellular traps (NETs) are key players in the development of cardiovascular disease; however, the specific effect of TCZ on these cells has not been described yet.

Objectives: To analyze the molecular changes (focused on monocyte and neutrophil abnormalities) underlying the beneficial effect of TCZ on atherosclerosis and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis.

Methods: Fifteen RA patients received 162 mg/week subcutaneous TCZ as combined therapy. Endothelial function was measured through post occlusive hyperemia using Laser-Doppler. To analyze the specificity of TCZ, blood samples from 5 RA patients with high disease activity not taking TCZ was used to perform in vitro studies. Isolated monocytes and neutrophils were treated in vitro with IL6 and blocking FcRII plus TCZ for 18 and 6 hours, respectively. Oxidative stress markers in leukocytes were analyzed by flow cytometry. NETosis was measured through Sytox staining of DNA fibers. Myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE) were analyzed in neutrophils by flow cytometry. mRNA expression of peptidyl arginine deiminase (PAD4) was measured by RT-PCR. Percentage of low density granulocytes (LDGs) was analyzed through flow cytometry. mRNA expression of genes involved in monocyte activation, prothrombotic state, lipid uptake and insulin resistance was analyzed in monocytes through RT-PCR. Activation of intracellular pathways was analyzed in monocytes using pathscan intracellular signaling array. Expression of miRNAs was evaluated in plasma.

Results: After 6 months of treatment, TCZ reduced clinical parameters of inflammation, autoimmunity and joint damage. Endothelial function was significantly restored. TCZ decreased peroxide and peroxynitrite levels in RA leukocytes, most significantly in monocytes and neutrophils. Percentage of LDGs was also reduced after treatment. TCZ in vivo treatment reduced the expression of MPO, NE and PAD4 in RA neutrophils. The generation of in vitro induced NETs was also inhibited by TCZ. The expression of inflammatory and prothrombotic molecules, genes involved in lipid uptake and cellular activation and insulin signaling and the activation of various intracellular pathways were modulated in monocytes after in vivo TCZ treatment. All these results were recapitulated after in vitro TCZ treatment of RA monocytes and neutrophils. Plasma levels of miRNA-223, miRNA-146 and miRNA-23, previously reported to be modified by anti-TNF α drugs, were also upregulated after TCZ treatment.

Conclusions: TCZ improves endothelial dysfunction and atherothrombosis through the restoration of the oxidative status, inhibition of the monocyte prothrombotic and inflammatory profile and the generation of NETosis

Acknowledgement: Funded by CTS7940, PI2013-0191, CP15/00158, PI15/01333

Disclosure of Interest: None declared

DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-eular.2545

Citation: Ann Rheum Dis 2016;75(Suppl2): 442

Session: Rheumatoid arthritis - etiology, pathogenesis and animal models

ABSTRACT NUMBER: 2599

TCZ Improves the Pro-Atherothrombotic Profile of Rheumatoid Arthritis Patients Modulating Endothelial Dysfunction, Netosis and Inflammation

Patricia Ruiz-Limon¹, Rafaela Ortega-Castro², IVÁN ARIAS DE LA ROSA², Carlos Perez-Sanchez², Yolanda Jiménez-Gómez², Maria Carmen Abalos-Aguilera¹, Pilar Font-Ugalde², Eduardo Collantes-Estévez², Alejandro Escudero-Contreras², Chary Lopez-Pedrerera² and **Nuria Barbarroja**²,
¹Rheumatology Service, IMIBIC/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain,
²Rheumatology service, IMIBIC/Reina Sofia Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain

Meeting: 2016 ACR/ARHP Annual Meeting

Date of first publication: September 28, 2016

Keywords: Cardiovascular disease, Inflammation, NETosis, rheumatoid arthritis (RA) and tocilizumab

SESSION INFORMATION

Date: Tuesday, November 15, 2016

Session Type: ACR Poster Session C

Session Title: Rheumatoid Arthritis – Small Molecules, Biologics and Gene Therapy - Poster III

Session Time: 9:00AM-11:00AM

Background/Purpose: Inhibition of the interleukin IL-6 receptor pathway by tocilizumab (TCZ) is an effective treatment for rheumatoid arthritis (RA). TCZ reduces atherosclerosis markers and improves endothelial function. In peripheral blood, TCZ increases the percentage of natural killer and regulatory T cells and decreases the number of inflammatory Th1/Th17 lymphocytes. Monocytes activation and neutrophil extracellular traps (NETs) are key players in the development of cardiovascular disease; however, the specific effect of TCZ on these cells has not been described yet. **Objective:** To analyze the molecular changes (focused on monocyte and neutrophil abnormalities) underlying the beneficial effect of TCZ on atherosclerosis and endothelial dysfunction in RA

Methods: Fifteen RA patients received 162 mg/week subcutaneous TCZ as combined therapy. Endothelial function was measured through post occlusive hyperemia using Laser-Doppler. To analyze the specificity of TCZ, blood samples from 5 RA patients at baseline was used to perform in vitro studies. Isolated monocytes and neutrophils were treated in vitro with IL6 and blocking FCRII plus TCZ for 18 and 6 hours, respectively. Oxidative stress markers in leukocytes were analyzed by flow cytometry. NETosis was measured through Sytox staining of DNA fibers. Myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE) were analyzed in neutrophils by flow cytometry. mRNA expression of peptidyl arginine deiminase (PAD4) was measured by RT-PCR. Percentage of low density granulocytes (LDGs) was analyzed through flow cytometry. mRNA expression of genes involved in monocyte activation, prothrombotic state, lipid uptake and insulin resistance was analyzed in monocytes through RT-PCR. Activation of intracellular pathways was analyzed in monocytes using pathscan intracellular signaling array.

Results: After 6 months of treatment TCZ reduced clinical parameters of inflammation, autoimmunity and joint damage. Endothelial function was significantly restored. TCZ decreased peroxide and peroxynitrite levels in RA leukocytes, most significantly in monocytes and neutrophils. Percentage of LDGs was also reduced after treatment. TCZ in vivo treatment reduced the expression of MPO, NE and PAD4 in RA neutrophils. The generation of in vitro induced NETs was also inhibited by TCZ. The expression of inflammatory and prothrombotic molecules, genes involved in cellular activation and insulin signaling and the activation of various intracellular pathways were modulated in monocytes after in vivo TCZ treatment. All these results were recapitulated after in vitro TCZ treatment of RA monocytes and neutrophils.

Conclusion:

TCZ improves endothelial dysfunction and atherothrombosis through the restoration of the oxidative status, inhibition of the monocyte prothrombotic and inflammatory profile and the generation of NETosis.

Funded by CTS7940, PI2013-0191, CP15/00158, PI15/01333

Disclosure: P. Ruiz-Limon, None; R. Ortega-Castro, None; I. ARIAS DE LA ROSA, None; C. Perez-Sanchez, None; Y. Jiménez-Gómez, None; M. C. Abalos-Aguilera, None; P. Font-Ugalde, None; E. Collantes-Estévez, None; A. Escudero-Contreras, None; C. Lopez-Pedrerera, None; N. Barbarroja, None.

To cite this abstract in AMA style:

Ruiz-Limon P, Ortega-Castro R, ARIAS DE LA ROSA I, Perez-Sanchez C, Jiménez-Gómez Y, Abalos-Aguilera MC, Font-Ugalde P, Collantes-Estévez E, Escudero-Contreras A, Lopez-Pedrerera C, Barbarroja N. TCZ Improves the Pro-Atherothrombotic Profile of Rheumatoid Arthritis Patients Modulating Endothelial Dysfunction, Netosis and Inflammation [abstract]. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68 (suppl 10). <http://acrabstracts.org/abstract/tcz-improves-the-pro-atherothrombotic-profile-of-rheumatoid-arthritis-patients-modulating-endothelial-dysfunction-netosis-and-inflammation/>. Accessed May 22, 2017.

ACR Meeting Abstracts - <http://acrabstracts.org/abstract/tcz-improves-the-pro-atherothrombotic-profile-of-rheumatoid-arthritis-patients-modulating-endothelial-dysfunction-netosis-and-inflammation/>

P23. Tocilizumab might prevent cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients through the modulation of endothelial dysfunction, NETosis and monocyte-mediated inflammation.

Authors: Ruiz-Limon P, Ortega R, Arias de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, Perez-Sanchez C, Gimenez-Gomez Y, Peralbo-Santaella E, Font P, Ruiz-Vilches D, Ferrin G, Collantes-Estevez E, Escudero-Contreras A, Lopez Pedrera Ch, Barbarroja N.

Group: GC5 Systemic and chronic inflammatory autoimmune diseases of the locomotor system and connective tissue.

Tocilizumab (TCZ) is an effective treatment for rheumatoid arthritis (RA). However, the changes occurred after TCZ therapy on endothelial dysfunction, monocyte activity, NETosis, and oxidative stress, principal effectors of atherosclerosis and cardiovascular disease, have not been analyzed. With this objective, twenty RA patients treated with subcutaneous TCZ for 6 months were evaluated. TCZ significantly restored endothelial function and decreased oxidative stress in RA leukocytes. Percentage of low density granulocytes and NETosis generation were reduced. The proinflammatory and

prothrombotic status of RA monocytes were also reversed through modulation of specific intracellular pathways. All these results were recapitulated after in vitro treatment with TCZ of RA monocytes and neutrophils, and in co-cultures with endothelial cells. Plasma levels of miRNA-223, miRNA-146 and miRNA-23 were upregulated by TCZ. In conclusion, TCZ prevents CVD through the restoration of the endothelial function, oxidative stress reduction, inhibition of monocytes' prothrombotic and inflammatory profile, and abridged NETosis generation.